

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

Liselle Luks

**Põlevkivi mikrobioloogiline töötlemine**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: PhD Anne Menert

MSc Hans Priks

MSc Triin Korb

Tartu 2019

## Sisukord

Infoleht.....	4
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1. Põlevkivi omadused ja keemiline koostis .....	6
1.2 Põlevkivi kaevandamine .....	7
1.3. Põlevkivi kasutusviisid ja nendest tulenevad keskkonnamõjud.....	9
1.4. Kivimite mikrobioloogiline leostamine .....	10
1.5. Anaeroobne lagundamine .....	14
1.5.1. Metanogenees orgaanika rikaste kivimite lagundamisel.....	17
2. Töö eesmärk.....	19
3. Materjalid ja meetodika .....	19
3.1Aeroobsed katsed.....	20
3.1.1 Mikroorganismide arvukuse määramine.....	22
3.1.2 Metallide analüüs.....	23
3.1.3 Elementanalüüs .....	23
3.2Anaeroobsed katsed .....	24
3.2.1Rõhu tõus .....	25
3.2.2 Gaasiproovid .....	26
3.2.3 Anaeroobse töötuse mõju hindamine skaneeriva elektronmikroskoobiga.....	27
4. Tulemused.....	28
4.1 Aeroobsed adapteerimiskatsed.....	28
4.1.1 Mikroorganismide arvukus .....	28
4.1.2 pH.....	33
4.1.3 Metallide saagis .....	36
4.1.4 Elementanalüüs .....	37
4.2 Anaeroobne katse.....	39
4.2.1 Rõhu muutus .....	39
4.2.2 Gaasianalüüs .....	41
4.2.3 Anaeroobse biofilmi iseloomustamine.....	42
5. Arutelu .....	45
5.1 Mikroorganismide arvukus .....	45
5.2 Metallide lahustuse sõltuvus pHst.....	45
5.3 Elementanalüüs .....	46

5.4 Metanogenees .....	46
5.4.1 Kaltsiumi mõju metanogeneesile .....	47
6. Kokkuvõte .....	48
7. Järeldused .....	49
8. Summary .....	50
Tänuõnad .....	52
Kasutatud kirjandus .....	53
Lisad .....	62
Lihthitsents .....	78

## Infoleht

### Põlevkivi mikrobioloogiline töötlemine

Eestis on põlevkivi energeetiliste vajaduste rahuldamiseks kaevandatud juba üle 100 aasta. Eesti põlevkivi ehk kukersiit on suhteliselt madala energeetilise väärtusega ning selle kaevandamise ja töötlemisega kaasneb hulgaliselt negatiivseid keskkonnamõjusid. Käesoleva töö eesmärk on uurida mikrobioloogilise töötlemise mõjusid põlevkivi orgaanilisele osale ning töötlusega kaasnevale metallide leostumisele. Mikrobioloogilise töötlemise mõju uuritakse mikroorganismide arvukuse, metallide leostumise skaneeriva elektronmikroskoopia abil.

### **Töö teadusala CERCS kood:**

B320- Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

T490- biotehnoloogia

**Märksõnad:** põlevkivi, biodegradatsioon, metanogenees, elektronmikroskoopia, jälgelemendid

### Oil shale microbiological processing

Estonia has mined oil shale for over 100 years to meet its energy consumption needs. Estonian oil shale kukersite is relatively low energy fuel which mining and processing has many negative aspects on the environment. The aim of this work is to study the effect of microbiological treatment to oil shale organic part and leaching of metals. The effect of microbiological treatment is studied via microorganisms number, leaching of metals and scanning electron microscopy.

### **CERCS research specialization:**

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

T490 Biotechnology

**Keywords:** oil shale, biodegradation, methanogenesis, electron microscopy, trace elements

## Sissejuhatus

Kogu inimkonna ja ka Eesti inimeste elu heaolu kasv suurendab üha enam vajadust uute energiaallikate leidmiseks. Lisaks kasvavale nõudlusele energiaga varustatuse järele, kasvab ka nõudlus tööstuses vajaminevatele metallidele. Siiani on Eesti koos muu Euroopaga tugevalt sõltunud imporditavatest metallidest. Eesti põhilist maavara põlevkivi on energeetilistel eesmärkidel kasutatud juba üle 100 aasta. Põlevkivi põletamine tagab Eestile energeetilise sõltumatuse, kuid on toonud kaasa keskkonnaprobleemid. Alternatiivseid põlevkivi töötlemise viise on vähe uuritud.

Üha karmimaks muutuvad keskkonnanõuded sunnivad mõtlema keskkonnasõbralikumate tehnoloogiate arendamisele ja kasutuselevõtule, mis on Eesti kontekstis oluline põlevkivi seisukohast. Eesti põlevkivile annab põlevad omadused orgaaniline aine, mille moodustavad selles kunagi elutsenud organismid. Lisaks sisaldab Eesti põlevkivi mikroelemente – Ni, Pb, Zn, Zr, Co, Sr, As, V ja Rb. Mikroelementide madala sisalduse tõttu ei ole neid võimalik kaevandada tavapäraseid kaevandusvõtteid kasutades, mõeldav oleks metallide mikrobioloogiline leostamine nt biokaevandamise abil.

Siiani on biokaevandamisel kasutatud atsidofiilseid metalle oksüdeerivaid mikroorganisme, et eraldada metalle sulfiidsetest mineraalidest, vähem on aga uuritud biokaevandamise võimalusi kivimi enda loomuliku koosluse kasutamise ja neutraalsel pH-l. Paljud aeroobsed mikroorganismid on võimelised lagundama põlevkivis leiduvaid orgaanilisi väevliühendeid (nt tiofeene), muutes need vees lahustuvateks ühenditeks (sulfaadid jne). Lisaks võivad need mikroorganismid leostada õlitööstuse jaoks soovimatuid metalle, nt. As ja V, võimaldades nende edasist eemaldamist põlevkivist.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida põlevkivi mikrobioloogilise töötlemise võimalusi aeroobsetes ja anaeroobsetes tingimustes Eesti ja Jordaania põlevkivi näitel. Mikrobioloogilise töötlemise mõju põlevkivile uuriti mikroorganismide arvukuse, metallide leostumise, biogaasi tekke ja pinna morfoloogia muutuste (skaneeriva elektronmikroskoopia) abil. Katsed on osa põlevkivi leostamise uuringutest projekti „Põlevkivi ja poolkoksi mikrobioloogilise töötlemise rakendusuuring“ raames ja teostati Tartu Ülikoolis koostöös ettevõttega BiotaTec OÜ.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Põlevkivi omadused ja keemiline koostis

Eesti põlevkivi ehk kukersiit on läbi aegade olnud Eesti olulisimaks maavaraks. Põlevkivi on tahket orgaanilist ainet ehk kerogeeni sisaldav savikas või karbonaatne settekivim. Just kerogeeni sisaldus annabki põlevkivile põlevad omadused ning selle sisalduse alusel toimub ka põlevkivide klassifikatsioon. Kukersiit sisaldab kerogeeni 15-70% [1].

Siiani ei ole täpselt teada, kuidas kukersiit tekkis. Põlevkivi kerogeen on pärit soolases meres elutsenud tsüanobakterite *Gloeocapsamorpha prisca* jäänustest. Kerogeeni settimine toimus ca 400-450 mln aastat tagasi Kesk-Ordoviitsiumi ajastul, kui Eesti paiknes praeguse Austraalia kohal [2]. Lisaks kukersiidile leidub Eestis ka graptoliitargilliidi nimelist põlevkivi, mida praegu ei kaevandata. Kaevandatava põlevkivi nimetus „kukersiit“ tuleneb Kukruse mõisa saksakeelsest nimetusest (*Kuckers*), mille lähedalt leiti 19.sajandil läbiviidud geoloogiliste tööde käigus kõige paksemad põlevkivi lasundid. [3]

Eesti leiukohtade põlevkivi keskmine kütteväärtus on suhteliselt madal – 3600 kcal/kg [3]. Seda võib võrrelda puidu keskmise kütteväärtusega (2500 kcal/kg) [4] või sorteerimata prügi kütteväärtusega (1600-3800 kcal/kg) [5]. Kukersiidi põletamisel saadakse ühest tonnist põlevkivist 350 kg põlevat osa, 550 kg tuhka ja 100 kg niiskust. Seega tekib põlevkivi põletamisel suurtes kogustes tuhka, st jäätmeid [3,6].

Vaatamata madalale kütteväärtusele on põlevkivi näol siiski tegemist Eesti olulisima energiatootmiseks kasutatava maavaraga. Majandusliku kasu alusel jaotatakse põlevkivi reserv aktiivseks ja passiivseks maavaraks. Aktiivse maavarana (energiasisaldus  $>35 \text{ GJ/m}^2$ ) on arvel  $5,0 \cdot 10^9$  tonni ning passiivse maavarana (energiasisaldus  $25\text{-}35 \text{ GJ/m}^2$ )  $3,5 \cdot 10^9$  tonni põlevkivi. Umbes 4% aktiivsest reservist asub piirkonnas, mille peale on rajatud hooneid ning seetõttu ei arvestata seda osa aktiivsesse reservi [1,7]. Energia tootmiseks kasutatakse põlevkivi kütteväärtusega 8,5-11 MJ/kg ning õlitootmiseks kõrgema kütteväärtusega (11,4-14 MJ/kg) põlevkivi [7]. Kukersiidi kütteväärtus erineb ka lasundi piires, olles suurem lasundi põhja- ja keskosas – 9-10,5 GJ/t (koos lubjakivi vahelasunditega) ja 12,5-13,5 GJ/t (ilma lasunditeta). Kütteväärtus väheneb lasundi lõuna ja lääne poole liikudes 5,0-7,5 GJ/t [7].

## **Põlevkivi keemiline koostis**

Põlevkivi (kukersiidi) põhilisteks koostisosadeks on süsinik (76-78%), vesinik (9-10%), hapnik (9-12%), lämmastik (0,2-0,5%), väävel (1,2-2,1%) ja kloor (0,5-0,9%) [8,9,12]. Kukersiidi põlevateks komponentideks on süsinik ja vesinik, mille aatomsuhte H/C järgi määratakse põlevkivi energeetiline väärtus. Mida suurem on aatomsuhe H/C seda suurem on õlisisaldus ehk seda kõrgema kütteväärtusega on põlevkivi [3]. Lisaks põlevatele komponentidele ning muudele elementidele sisaldab põlevkivi nii anorgaanilisi kui ka orgaanilisi väevliühendeid [10].

Põlevkivi mineraalne osa koosneb karbonaatsest osast (kaltsiit ja dolomiit, 15-70%) [2], silikaatsest osast (15-40%) ning savimineraalidest [9]. Mineraalse osa täpsem koostis on – SiO<sub>2</sub> (20-36%), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+TiO<sub>2</sub> (6-11%), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (3-6%), CaO (34-60%) ja MgO (2-7%) [9]. Nii põlevkivi kui ka põlevkivituhk sisaldavad metalle. Põlevkivist on määratud Ba, Cr, Mn, Ni, Sr ja Cu [3], põlevkivituhast lisaks As, Mo, Ni, Pb, Zn, V ja Co [11]. Põlevkivis võivad sisalduda ka mõned haruldased elemendid, nagu näiteks U, Mo, V, Re, Ge ja Be [12].

## **Väävel**

Põlevkivi sisaldab 1,2-2,1%, väävlit, millest ligikaudu 30% on orgaanilised ja 70% anorgaanilised väevliühendid. Anorgaaniline väävel esineb enamasti püriidi või markassiidina. Väike osa väevliühenditest esineb ka sulfaadina; selle sisaldus sõltub põlevkivi lasumissügavusest. Väävel esineb orgaanilistes ühendites kas aromaateses tsüklites või alifaateses funktsionaalrühmades (merkaptaanid, alifaatsed või arüülsulfiidid, -disulfiidid) [10]. Põlevkivi väävlisisaldus on selle kasutamise seisukohast murettekitav, mõjutades negatiivselt nii põlevkivi töötlemiseks kasutatavat aparatuuri kui ka välisõhu kvaliteeti [13]. Väävli puhul on oluline selle jaotus erinevate agregaatolekute vahel. Kütuse ja lendtuha uuringutes on leitud, et põletamisel vabaneb 40-50% väävlist gaasifaasi. Metallidest lähevad gaasifaasi 40-50% Se ning 25-35% As, Cd ja TI. Teised elemendid v.a. Cl, Br ja jäävad 90% ulatuses tuhka. Enamus põlemise käigus tekkinud SO<sub>2</sub> neutraliseeritakse CaO-ga põletusahjus ja gaasikanalites enne kui suitsugaasid atmosfääri vabanevad. CaO on CaCO<sub>3</sub> lagunemisprodukt kõrgel temperatuuril [10].

## **1.2 Põlevkivi kaevandamine**

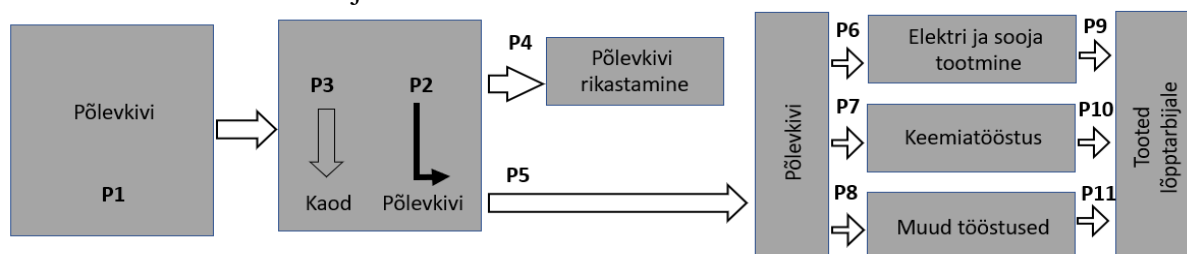
Aastaks 2019 on põlevkivi kaevandatud ja tööstuslikult kasutatud juba üle 100 aasta. Esimene suurtarbija oli Kunda tsemenditehas, mis 1921.aastal muudeti täielikult põlevkivikütteliseks [3]. Kokku on Eestis lubatud kaevandada keskmiselt 20 miljonit tonni põlevkivi aastas [14,15],

kuid ükski kaevandusloa saanud ettevõtte ei ole talle antud loa piires põlevkivi täielikult ära kaevandanud. Alates 2009. aastast on põlevkivi kaevandatud keskmiselt 15 mln t aastas [14].

Eestis on 0,5-1% maailma põlevkivi varudest, kuid Eesti kaevandab rohkem kui 48% maailmas kaevandatavast põlevkivist – see teeb Eestist maailma suurima põlevkivikaevandaja [16]. Lisaks Eestile kaevandatakse põlevkivi veel Hiinas, Venemaal, USA-s, Saksamaal ja Austraalias [17]. Viimase 95 aasta jooksul on põlevkivi mänginud Eesti majanduses olulist rolli. Alates põlevkivi kaevandamise algusest (1916. a.) on põlevkivi kaevandatud üle  $1,6 \cdot 10^9$  tonni, mis on kolmandik kogu olemasolevast reservist [1,18]. Eestis kaevandatavast põlevkivist toodetakse elektrit, soojusenergiat ja põlevkiviõli.

### Kaevandamistehnoloogiad

Kaevandamine jaguneb pealmaa- ja allmaakaevandamiseks. Pealmaakaevandamist kasutatakse, kui põlevkivi asub kuni 30 meetri sügavusel; sügavamal asuvate lasundite korral eelistatakse allmaakaevandamist. Lisaks põlevkivi lasumissügavusele sõltub kaevandustehnoloogia valik geoloogilistest, hüdrogeoloogilistest ja keskkonnakaitse tingimustest. [14] Enne 2009. aastat olid enamus kaevandustest pealmaakaevandused, kuid peale seda on kasvanud allmaakaevanduste osakaal [2,14]. Põlevkivi kaevandamisega kaasnevad materjalikaod: pealmaa kaevandamisel on põlevkivi kaod 4-12% ning allmaakaevandamisel 25-30% [7]. Suuremad kaod allmaakaevandamisel on tingitud sellest, et osa põlevkivi jäetakse käikude toetamiseks ning varingute vältimiseks kaevandamata. Põlevkivi peal- ja allmaakaevandamise skeem on toodud lisas 1. Sõltumata sellest, kas põlevkivi väljati peal- või allmaakaevandamisega on järgmine tööstuslik samm rikastamine, mille käigus tõuseb põlevkivi energeetiline väärtus [82]. Rikastamine teostatakse kaevandamise kohas ning selle käigus eraldatakse põlevkivist lubjakivi tükid. Ka rikastamisega on seotud põlevkivi kaod (varasemalt 3-6%), kuid need on aja jooksul vähenenud [1]. Põlevkivi töötlemise skeem on esitatud joonisel 1.



**Joonis 1.** Põlevkivi töötlemise skeem [13]. P1 - põlevkivi kaevandatav reserv; P2 - põlevkivi kaevandamine; P3 - põlevkivi kaevandamise kaod; P4 - rikastamisele minev põlevkivi; P5 - rikastamata põlevkivi tarbijatele; P6 - põlevkivi elektri ja soojuse tootmiseks; P7 - põlevkivi keemiatööstusele; P8 - põlevkivi muudele tööstustele (nt tsemenditootmine); P9 - elektri- ja soojusenergia tarbimine lõpp- tarbijate poolt (v.a Eesti Põlevkivi); P10 - põlevkivikeemiatööstuse toodang; P11 - muude põlevkivitööstuste toodang.



### 1.3. Põlevkivi kasutusviisid ja nendest tulenevad keskkonnamõjud

Põlevkivil töötavad ettevõtted on mitukümmend aastat olnud Eesti ja Euroopa Liidu suurimad keskkonnasaastajad [5]. Põlevkivi kaevandustest emiteeruvad heitgaasid moodustavad vaid 0,5% SO<sub>2</sub>, 0,2% NO<sub>x</sub> ja 0,5% CO kogu põlevkivi töötlemisega seotud emissioonidest [18]. Peamine osa heitgaasidest emiteerub põlevkivi põletamise käigus, nt ühe tonni põlevkivi põletamisel eraldub umbes üks tonn CO<sub>2</sub>. [5]. Põlevkivi põletatakse elektri- ja soojusenergia saamiseks. Põlevkivist elektrienergia tootmiseks kasutatakse otsepõletamist ja töötlemisel tekkiva uttegaasi põletamist. Otsepõletamise põletamistehnoloogiad jagunevad omakorda kaheks – tolmpõletamine ja tsirkuleerivas keevkihis põletamine. [13,83]

Tolmpõletamisel kasutatakse Eestis tahkešlaki ärastusega frontaalpõletiga leekkoldeid, mille mehhaaniline soojuskadu põletamisel on 1-2%. Tegemist on tänapäeval levinuima tahke kütuse põletamistehnoloogiaga. [83]. Soojusenergia tootmisel tolmpõletamisel emiteerub kõrge SO<sub>2</sub> sisaldusega heitgaas ning see tehnoloogia on suhteliselt madala netokasuteguriga (30%) [13]. Alates 2012. aastast kehtib Euroopa Liidus SO<sub>2</sub> heite piirang 25 tuhat t aastas [19]. Sellest tulenevalt on kateldele paigaldatud deSO<sub>x</sub> seadmed, mis vähendavad oluliselt SO<sub>2</sub> emissiooni, aga ka energiatootmisplokkide kasutegurit. [14] Väävli- ja lämmastikuühendite vähenenud emissiooni näitab Lõuna-Soome ja Leningradi oblasti metsade ja järvede hapestumise vähenemine ning Euroopa Liidu direktiivist tulenevatele nõuetele vastamine [19].

Uuem põletamistehnoloogia on tsirkuleerivas keevkihis põletamine, kus kasutatakse kõrgema kütteväärtusega (8,0-11 MJ/kg) põlevkivi ning madalamaid põletamistemperatuure (madalatemperatuurilise korral 300-400°C ja kõrgtemperatuurilise korral 800-850°C) [21,83]. Tsirkuleerivas keevkihis põletamisel on mehhaaniline soojuskadu 1-1,5%. Kevvkihtpõletamist kasutatakse soojusenergia tootmiseks.[83]. Tsirkuleerivas keevkihis põletamist peetakse paremaks vähese SO<sub>2</sub> ja NO<sub>x</sub> emissiooni (ka ilma spetsiaalsete suistugaasi puhastusseadmeteta) ning suurema kasuteguri pärast. Tsirkuleerivas keevkihis saab põletada ka biokütuseid (turvas, puit) ning mäetööstuse rikastusjäätmek. [19,38,83] Selle tehnoloogia puuduseks on aga tuhka seotav suur väävli kogus [20,21]. Kõik põlevkivi põletamisviisid tekitavad palju tuhka [6,13], mis on ohtlik jääde ja moodustas nt 2002. a 85% kogu Eestis tekkinud ohtlikest jätmetest [13]. Vaid 30% tuhasta leiab kasutust, seda peamiselt põllumajanduses ja ehitusmaterjalide tootmises [6].

Õli tootmiseks kasutatakse umbes 12% kogu kaevandatavast põlevkivist. Kiviteri protsessiga (vertikaalsed retordid) toodetakse õli Viru Keemia Grupp AS-s (VKG, õlisaagis 17-17,5%,

keemilise protsessi efektiivsus 72-75%) [22] ning Galoteri protsessiga (tahked soojuskandjad) toodetakse õli Narva EJ Õliteshas (õlisaagis 13,6%, keemilise protsessi efektiivsus 80-85%) [9].

Lisaks õhule saastub põlevkivi kaevandamise ja töötlemise käigus ka vesi. Kaevanduskäigud, mida enam ei kasutata ujutatakse üle ning sinna alles jäänud sulfiidne väävel (püriit) oksüdeeritakse vees sisalduva hapniku poolt sulfaadiks. Selletõttu tõuseb järsult vees sisalduva sulfaadi hulk (300-600 mg/l-lt 1200-1500 mg/l-ni). Hiljem sulfaadisisaldus väheneb, kuid jääb siiski looduslikust foonist kõrgemaks [13,23]. Põhjaveele kujutab ohtu veel tuhamägedest leostuv tugevalt aluseline vesi [2,24] ning aheraine mägede põlemisel leostuv fenooliderikas vesi [25].

Suhteliselt suurte kaevandamise ja töötlemise kadude ning ulatuslike keskkonnamõjude tõttu on vajalik uurida põlevkivi alternatiivseid töötlemisvõimalusi. Põlevkivi arengukava aastateks 2016-2030 seab eesmärgiks uuemate ja paremate kaevandustehnoloogiate uuringud. Uute tehnoloogiate arendamise käigus pööratakse tähelepanu nii põlevkiviga kaasnevatele maavaradele (nt. metallid) kui ka maardlate kaevandustundlikkusele. [14]

#### 1.4. Kivimite mikrobioloogiline leostamine

Biokaevandamine on üldine termin, mida kasutatakse metalle sisaldavate maakide ja kontsentratsioonide mikrobioloogilise töötlemise tähistamiseks. Alates 1960-ndatest leiab biokaevandamine üha enam kasutust. Algul kasutati biokaevandamist vase eraldamiseks sellistest „kivikuhjadest“, milles vasesisaldus oli kas liiga väike tavapäraseks sulatamiseks või kus ei saanud kasutada tavapäraseid kaevandusmeetodeid [26]. Bioleostamine on uuenduslik meetod madala metallide sisalduse ja polümetalliliste maakide töötlemiseks, kuid ka juhul kui mõningate elementide (nt arseen) sisaldus kahjustaks sulatamise seadmeid või kus keskkonnatingimused soosivad pigem biokaevandamist [26]. On tõestatud, et mikroorganismide kasutamine leostamisprotsessides tõstab metallide eraldamise saagikust [27,28].

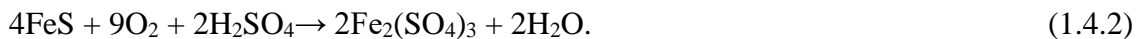
Bioleostamine põhineb bakterite võimel vabastada mineraalidest nende elutegevuseks vajalikke elemente ning kasutada neid toitainete või energia saamiseks [29]. Metallide bioleostamine on aeganõudev protsess, sest mikroorganisme tuleb laboratoorselt adapteerida mitmete edasikülvide tegemise kaudu [30]. Adapteerimise eesmärgiks on välja töötada kooslus, milles on reeglina rohkem kui üks liik ning mis antud maagi bioleostamiseks kõige paremini sobib [26].

Mikroorganismide kasvu mõjutavad temperatuur, pH ning katioonide ja anioonide hulk vees [31]. Temperatuurioptimumi alusel jagatakse mikroorganismid psührofiilideks (5-15°C), mesofiilideks (20-40°C), mõõdukateks termofiilideks (40-60°C) ja ekstremofiilideks (60-80°C) [32]. Bioleostamises kasutatavad mikroorganismid erinevad üksteisest ka erineva pH taluvuse poolest [33]. Mikroobikooslus ei ole püsiv, vaid võib ajas muutuda [26].

Varasemate uuringute käigus on leitud, et mikroorganismid suudavad ellu jääda ka kõrgete raskmetallide kontsentratsioonide juures – 5 g/l Co, 23 g/l Ni, 38 g/l Fe ja 36 g/l Cu , kuid nende kasvu võivad takistada kõrged anioonide ( $S^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$ ) kontsentratsioonid [31].

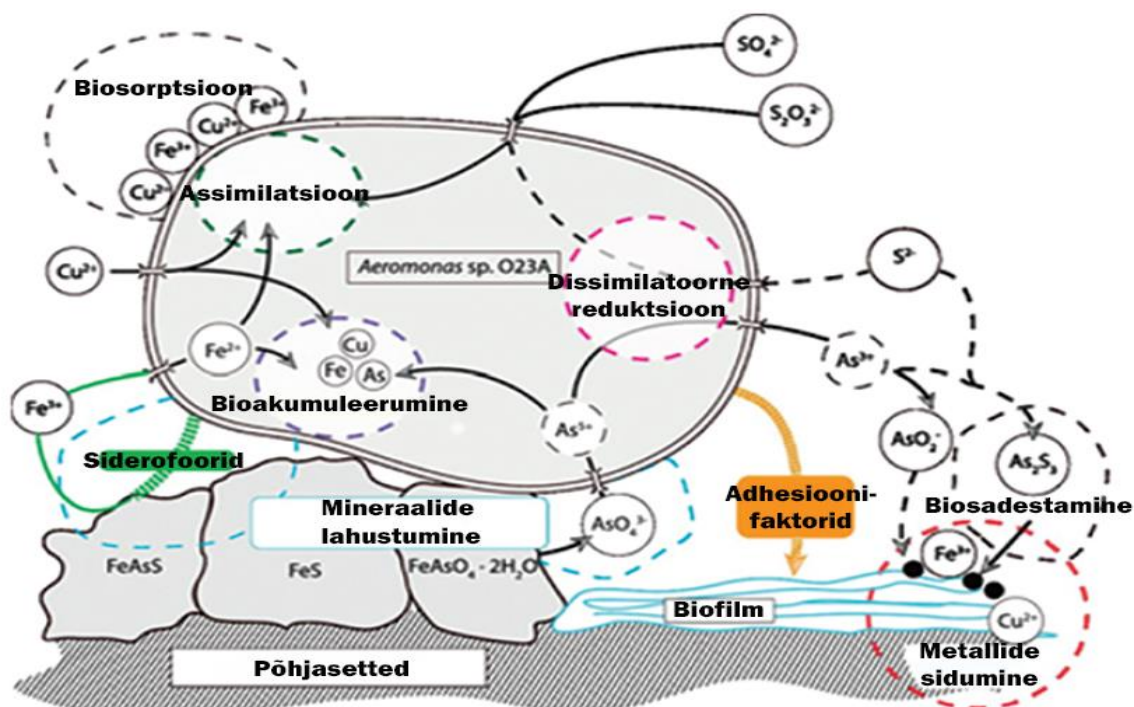
Metallide tööstuslik biokaevandamine kasutab atsidofiilseid kemolitotroofseid Fe ja S oksüdeerivaid mikroorganisme. Biokaevandamise käigus vabaneb väävelhape, millel on kolm kasulikku omadust: 1) happelise keskkonna loomine atsidofiilide kasvuks (pH 1,5-2,5); 2) metallide lahustumise kiirendamine; 3) lahustunud metallide lahuses hoidmine [34].

Peamiste sulfiidsete mineraalide oksüdeerimisreaktsioonid raskesti töödeldavates maakides on esitatud valemitega 1.4.1 ja 1.4.2 [26]:



Kõrge püriidisisaldusega kontsentratsioonide töötlemise käigus tekib palju hapet, mis tuleb lubja või lubjakiviga neutraliseerida [26].

Enamus neutrofiilsete heterotroofidega tehtud bioleostamise katsetest on tehtud aeroobsetes tingimustes. Sel juhul kogunevad metaboliidid (atsetaat, sulfaat, ammooonium) söötmesse ning



Joonis 2. *Aeromonas sp. O23A* mõju arseeni ringlusele [29].

pärsvad edasist orgaanilise aine lagunemist ja seega ka metallide leostumist. [35,36]. Poolas Zloty Stok kaevanduses uuriti *Aeromonas sp. O23A* tüve mõju As ringlusele. O23A kasutab As enda hingamisprotsessis elektroniakceptorina. Hingamise käigus vabastatakse keskkonda toksiline ja suure liikuvusega  $As^{3+}$ . [29] Protsessi täpselt mõistes ning kontrollides on seda võimalik ära kasutada metallide bioleostamiseks [27]. O23A on ka laboratoorselt hästi kasvatatav *Aeromonas sp.* tüvi, sest kasvab laias temperatuuri vahemikus 4-42°C (optimumiga 22-30°C) neutraalse pH juures ning aeroobsetes tingimustes. *Aeromonas sp. O23A* tüvega seotud As ja Fe sidumise ning sadestamise mehhanismid on kujutatud joonisel 2. [29] Lisaks eelnevalt mainitule on joonisel näha ka biofilm, mille moodustamine sõltub süsiniku kättesaadavusest. Seega saab bioloogiliselt kättesaadava süsiniku hulka muutes mõjutada biofilmi tekkimist ning selle paksust. [29] As ja Se sisaldavad mineraale leostatakse sageli bioleostamisega, sest nad moodustavad stabiilseid sidemeid mitmete metallidega (Fe, Co ja Ni) ning mitmetallidega nt S. [37]

Kuhjas bioleostamise adapteeritud kultuuri välja töötamisel pole oluline mitte rakkude kiire jagunemine, vaid koosluse liigiline mitmekesisus. Kuhjas on samaaegselt mitmeid erinevaid keskkonnatingimusi ning seetõttu on neis ka erinevad mikroorganismide konsortsiumid. [26,38]

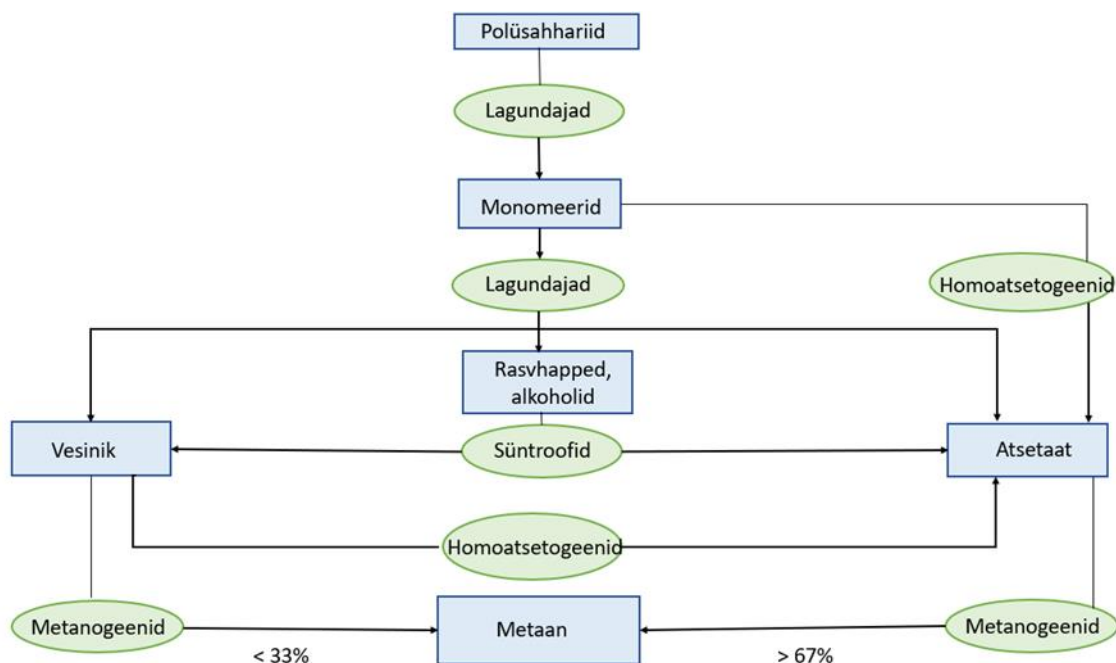
13

## 1.5. Orgaanilise materjali anaeroobne lagundamine

Anaeroobse lagundamine on protsess, mille käigus lagundatakse keerulised pikaahelaga süsivesinikud mikroorganismide abil metaaniks ja süsihappegaasiks [41,42]:



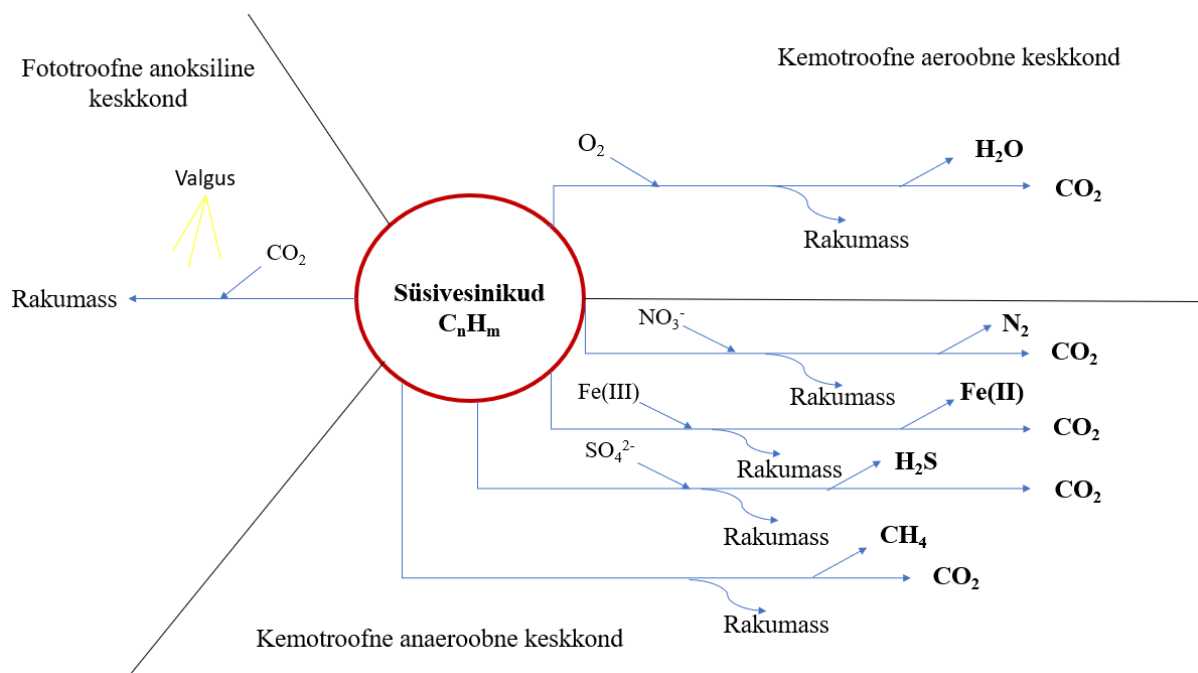
Lagundamine toimub nelja mikroorganismide rühma – kääritajate, süntroofsete atsidogeenide, atsetogeenide ja metanogeenide koostöös, mille tulemusena on võimalik kogu biomass lagundada metaaniks ja süsihappegaasiks [43,44,45]. Metaan on süsivesinike bioloogilise lagunemise peamine produkt. Anaeroobse lagundamise skeem on esitatud joonisel 4.



**Joonis 4.** Anaeroobse lagunemise skeem tähtsamate vaheühendite ja mikroobirühmadega [42].

Metanogenees seisneb keerukate, vees lahustumatute ühendite muutmises vees lahustuvateks ühenditeks ning tekkinud vaheühendite gaasistamises. Sellega kaasneb orgaanilise substraadi osaline või täielik mineralisatsioon. [43] Just biogaasi eraldumise tõttu on anaeroobset lagundamist uuritud juba üle 140 aasta. Biogaas on mikroorganismide konsortsiumi elutegevuse tagajärjel tekkiv kõrge energiasisaldusega kütus [84]. Biogaasi tootmine võimaldab 1) biomassis sisalduvat energiat kasutada, talletada ja teise asukohta transportida; 2) orgaanilised jäätmed väetiseks töödelda ning selle kaudu vähendada jäätmetest tulenevat keskkonnoahtu [85]. Biogaasi koostis sõltub anaeroobselt lagundatavast materjalist, koosnedes tavapäraselt CH<sub>4</sub> (50-75%), CO<sub>2</sub> (25-45%) ning vähesel määral ka H<sub>2</sub>S (0-1%), H<sub>2</sub> (0-1%), CO (0-2%), N<sub>2</sub> (0-2%), NH<sub>3</sub> (0-1%), O (0-2%) ja H<sub>2</sub>O (2-7%) [46].

Metanogeneesi saagis on 0,35 m<sup>3</sup>metaani 1 kg orgaanilise kuivaine kohta [44, 47, 54]. Ühe m<sup>3</sup> biogaasi (sisaldab 60-70% metaani) kütteväärtus on 26 MJ/m<sup>3</sup>. See on võrreldav 0,77 m<sup>3</sup> maagaasi kütteväärtusega (33,5 MJ/m<sup>3</sup>) või 2,2 kg puidu kütteväärtusega (13,3 MJ/m<sup>3</sup>) [48]. Süsivesinike lagunemiskeemilt erinevates keskkondades on samuti näha, et metaan eraldub süsivesinike anaeroobse lagunemise tulemusena (joonis 5).



**Joonis 5.** Süsivesinike lagunemisrajad erinevates keskkondades (aeroobne, anoksiline, anaeroobne) [49].

### Anaeroobse lagunemise astmed

Anaeroobsetest lagundamisprotsessidest võtavad osa paljud erinevad mikroorganismide liigid – hüdrolyüsijad, happe moodustajad, atsetogeenid ja metaanitootjad (joonis 4). [44]

**Hüdrolyüsi** käigus lagundatakse polümeriseerunud ning enamasti lahustumatud orgaanilised ühendid (süsivesinikud, valgud, rasvad) lahustuvateks monomeerideks ja dimeerideks (monosahhariidid, aminohapped, rasvhapped). [47]



Hüdrolyüsi efektiivsus sõltub substraadi osakeste suurusest, pH-st, ensüümide tootmisest ning ensüümide difusioonist ja adsorptsioonist lagundamisel olevale osakesele. Hüdrolyüsi viivad läbi anaeroobide perekonnad *Streptococcus* ja *Enterobacterium*. [47]

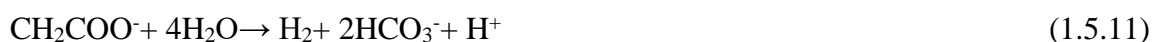
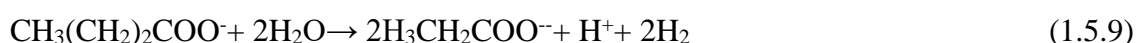
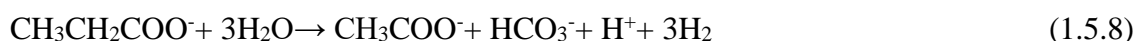
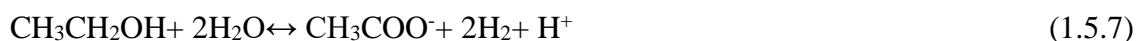
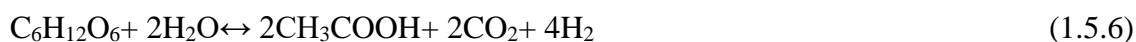
**Atsidogeneesi** käigus lagundavad hapestavad bakterid vesilahustuvad ühendid (k.a. hüdrolyüsi produktid) lühikese ahelaga orgaanilisteks hapeteks (formaad, atsetaad, propionaad, butüraad ja

pentanaat), alkoholideks (metanool, etanool), aldehüüdideks, süsihappegaasiks ja vesinikuks [50].



Valkude, aminohapete ja peptiidide lagunemisel tekkivad produktid on anaeroobsetele mikroorganismidele energiaallikaks [50]. Tavaline lagundamisrada kulgeb atsetaadi, süsihappegaasi ja vesiniku tekke kaudu (joonis 4). Juhul kui metanogeenid ei kasuta tekkinud ühendeid kohe ära, muudetakse need atsetogeneesi abil taas atsetaadiks [47]. Atsidogeneesi käigus tekkivad ka ebameeldiva lõhnaga ammoniaak ja divesiniksulfiid [45]. Atsidogeneesi läbi viivad bakterid on fakultatiivsed anaeroobid, kes on võimelised tarbima keskkonnas leiduva hapniku. Sellega loovad nad sobiva kasvukeskkonna fakultatiivsetele (*Bacillus*) ja obligatoorsetele anaeroobidele (*Clostridium*) [47].

**Atsetogeneesi** käigus lagundavad atsetogeensed bakterid (*Syntrophomonas* ja *Syntrophobacter*) atsidogeneesi käigus tekkinud ühendid atsetaadiks ja vesinikuks [50, 51]:



Moodustunud atsetaati ja vesiniku kasutavad metanogeenid järgmise etapina toimuva metanogeneesi käigus. Atsetogeneesi käigus vabanev vesinik on atsetogeneesi läbi viivatele bakteritele toksiline. Selle toksilisusega toimetulekuks on kujunenud süntroofia atsetogeensete bakterite ja autotroofsete metanogeenide vahel. [52] Süntroofia on mikroorganismide vaheline suhe, milles kaks populatsioonis olevat liiki on teineteisele kasulikud [53]. Atsetogeneesi määrab biogaasi tootmise efektiivsuse, sest umbes 70% metaanist eraldub atsetaadi redutseerumise käigus. Selletõttu on ka atsetaat põhiline metaani tootmisele kaasa aitav vaheühend. [47]



**Metanogeneesi** käigus toodavad metanogeensed arhed metaani. Metaani toodetakse kas hüdrogenotroofsel metanogeneesis eelnevatel etappidel toodetud vesinikust ja süsihappegaasist (1.3.12) või atsetoklastilisel metanogeneesis atsetaadist (1.3.13) [51].



Metanogeneesis saab atsetaadi asemel substraadina kasutada ka formaati (1.3.14), metanooli (1.3.15) [51] ja metüülamiini või dimetüülsulfiidi [47]



Lisaks metanoolile (1.3.15) või trimetüülamiinile [54] võivad metanogeenid substraadina tarbida ka betaiini (trimetüülglytseriini) [55,56]. Metanogeneesi viivad läbi põhiliselt metanogeensed arhed. Enamus metanogeneesi käigus eralduvast metaanist toodetakse heterotroofsete metanogeenide poolt ja vaid 30% eralduvast metaanist hüdrogenotroofsel (1.3.12) metanogeneesis süsihappegaasi taandamisel. [46] Metanogeene kasvatades on väga oluline hea puhverdusvõimega söötme valimine, sest kääritamise käigus tekivad metaboliidid, mis hapestavad keskkonda kiiresti, kuid metanogeensed mikroorganismid eelistavad kergelt aluselist keskkonda (pH 6,8-7,5) [30]. Lisaks pH-le on oluline ka mikroelementide ja vitamiinide kättesaadavus. [30] Metanogeneesi käigus kasutatakse ära vesinik, luues selle kaudu sobilikud elutingimused happeliste bakterite arenguks. [46]

#### 1.5.1. Metanogenees orgaanika rikaste kivimite lagundamisel

Konventsionaalsete ressursside ja maagaasi järjest kasvava nõudluse tõttu on tekkinud huvi mittekonventsionaalsete maavarade järele. Biogeense metaani tootmisega on seotud mitmed anaeroobsed mikroorganismid, kes suudavad lagundada kerogeenis sisalduvaid keerulisi geopolümeere. Metaani toodetakse settekivimis sisalduvast orgaanilisest ainest, mille kompleksuse tõttu saavad seda lagundada vaid süntroofset koostööd tegevad mikroorganismid. Vaatamata kerogeeni kompleksusele on kilt ja süsi kõrge orgaanilise süsiniku sisalduse tõttu mikrobioloogilise tegevuse jaoks sobiv substraat. [57]

Metaaniks saab lagundada isegi aromaatsid ja küllastunud süsivesinikke, mis moodustavad ligikaudu 80% õli koostises olevatest süsivesinikest.[58] Kerogeen koosneb väga keerulistest polümeeridest. Erinevas vanuses setetes olev kerogeen on kõige suuremahulisem orgaanilise süsiniku vorm planeedil (üle 10<sup>09</sup> tonni süsinikku). [59] Viimastel aastakümnetel on leitud aga

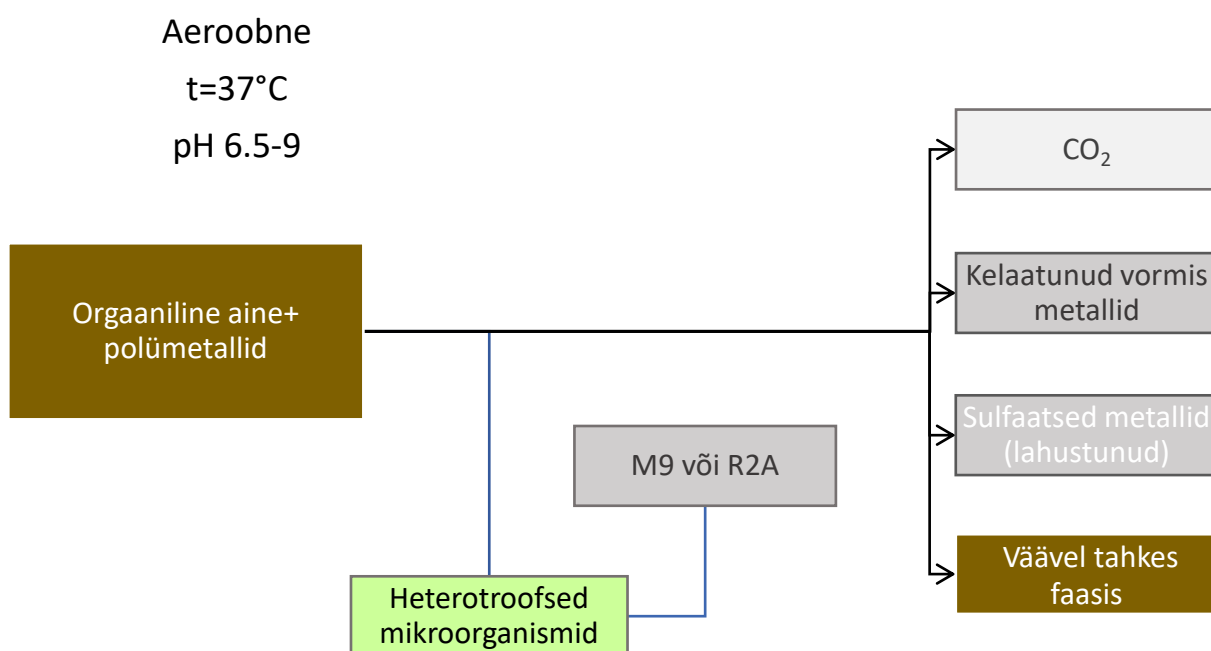
ka mikroorganisme, kes suudavad anoksilistes tingimustes kasutada küllastunud ja aromaatsed süsivesinikke kasvusubstraadina. Need mikroorganismid kasutavad anaeroobse hingamise käigus elektronakseptorina  $\text{NO}_3^-$ , Fe (III) või  $\text{SO}_4^{2-}$  ning kasvavad süntroofsetes kultuurides või fotosünteesiga (joonis 5). [49, 60, 61]

## 2. Töö eesmärk

Töö eesmärgiks oli uurida põlevkivi mikrobioloogilise töötlemise võimalusi Eesti ja Jordaania põlevkivi näitel, rikastada vastavad mikroobikooslused ja töötada välja kohane analüüsimetoodika.

## 3. Materjalid ja metoodika

Magistritöö raames teostati katseid nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes. Aeroobsetes tingimustes viidi mikrobioloogilise töötlemise katsed Eesti põlevkiviga läbi 339 päeva jooksul ja Jordaania põlevkiviga 81 päeva jooksul, anaeroobsetes tingimustes Eesti põlevkiviga 60 päeva jooksul. Aeroobsete katsete skeem on toodud joonisel 6.



**Joonis 6.** Aeroobsete katsete skeem

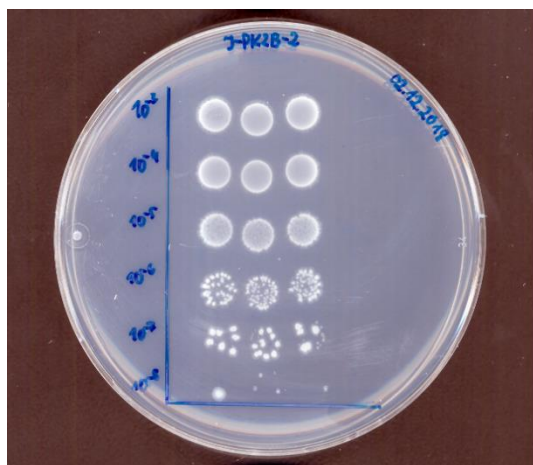
### 3.1. Aeroobsed katsed

Aeroobsed katsed viidi läbi 250 ml kolbides, kus aeroobsus tagati õhu lisandumisega avause kaudu (kolvid kaetud foolimiga). Proovide tähistus on toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Aeroobsete Eesti põlevkivi katsete tähistus

Proovitähis	M9	R2A	Töötlemata põlevkivi	Kuumtöödeldud põlevkivi	Inokulum 98
PK1A- põlevkivi+ M9+ inokulum 98	X	(-)	x	(-)	x
PK1B-põlevkivi+ M9	X	(-)	x	(-)	(-)
PK1C- kuumtöödeldud põlevkivi+ M9	X	(-)	(-)	x	(-)
PK2A-põlevkivi+ R2A+ inokulum 98	(-)	X	x	(-)	x
PK2B- põlevkivi+ R2A+	(-)	X	x	(-)	(-)
PK2C-kuumtöödeldud põlevkivi+ R2A	(-)	X	(-)	x	(-)

Katsetes kasutati pulbriks jahvatatud põlevkivi kütteväärtusega 9,4 MJ/kg ning üldväävli sisaldusega 1,52%. Proovide 1A, 1B ning 2A, 2B puhul kasutati töötlemata põlevkivi ning katsetes 1C ja 2C kolm korda 121°C juures 24 tunniste vahedega kuumtöödeldud põlevkivi. Nii töötlemata kui kuumtöödeldud põlevkivi ei olnud steriilsed, vaid sisaldasid mikroorganisme. Kolooniaid moodustavate ühikute loendamise (CFU/ml – *colony forming unit/ml*) abil leitud kolooniade arvu alusel koostati graafik, millelt on näha mikroorganismide arvukuse muutus ajas. Väljakülve tehti söötmega R2A Petri tassidele lahjendusfaktoriga  $10^3$ - $10^8$  ning pandi 24 tunniks 37°C juurde kasvama. 24 tunni möödudes loendati üleskasvanud kolooniad ning leiti mikroorganismide arvukus algproovis. Igast väljakülviga Petri tassist tehti ka foto, et üleskasvanud kultuure vajadusel uuesti vaadata (joonis 7).



**Joonis 7.** Mikroorganismide arvukuse määramine väljakülvide meetodil

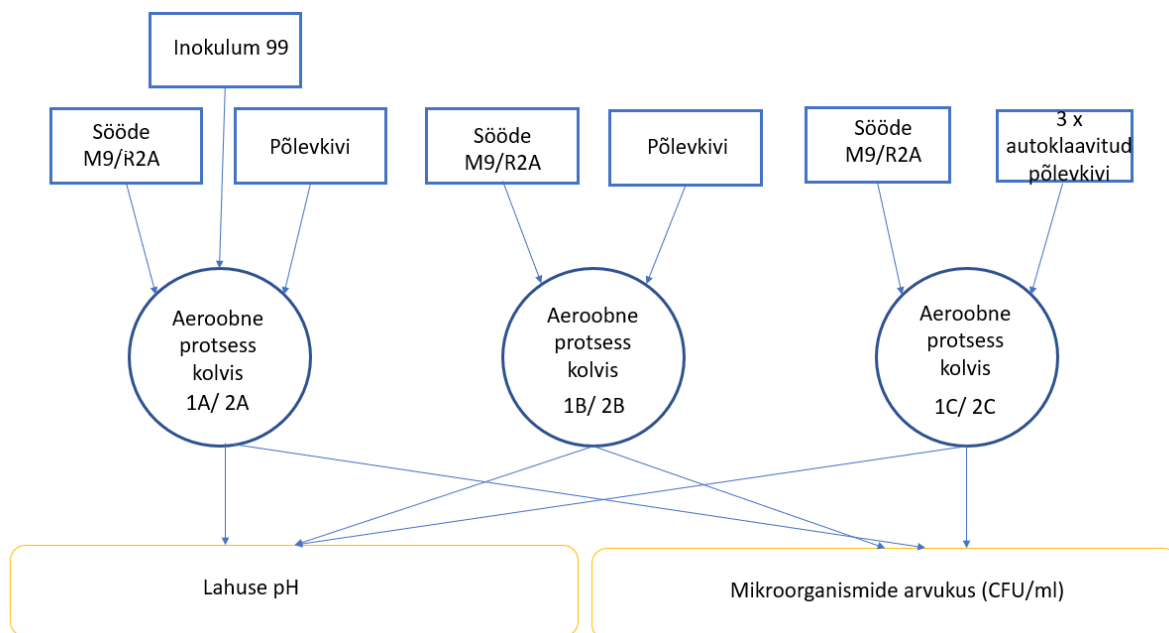
Põlevkivikatsete PK1A ja PK2A inokuleerimiseks kasutati inokulumi 98. Inokulum 98 on koosluselt ARGCON5 aeroobsetes tingimustes Lääne faatsisese graptoliitargilliidi ja M9

vedelsöötmega rikastatud kooslus. ARGCON5 (edaspidi 5A) on hea metalle leostav ja kõrge metaanitootlikkusega kooslus, mis isoleeriti graptoliitargilliidilt anaeroobsetes tingimustes R2A vedelsöötmes (lisandid  $\text{NaHCO}_3$ , tsüsteiin,  $\text{Na}_2\text{S}$ ). [30,67] Koosluses 5A olevad mikroorganismid on heterotroofsed fakultatiivsed anaeroobid ja metanogeensed arhed [30, 67]. Eesti põlevkivi aeroobsetes katsetes kasutati kultiveerimiskeskkonnana kahte erinevat vedelsöödet – M9 ja R2A. M9 on tugeva puhverdusvõimega mineraalsööde ( $33,9 \text{ g/l Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $15 \text{ g/l}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $5 \text{ g/l}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $2,5 \text{ g/l NaCl}$ ) [62] Söötme R2A puhverdusvõime on kolm korda nõrgem kui söötmel M9 ( $0,5 \text{ g/l}$  pärmiekstakt,  $0,5 \text{ g/l}$  liha peptoon,  $0,5 \text{ g/l}$  casamini happed,  $0,5 \text{ g/l}$  glükoos,  $0,5 \text{ g/l}$  tärklis,  $0,3 \text{ g/l}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,05 \text{ g/l}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $0,3 \text{ C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ ) [63]

Mikroobikooslusluse (inokulum 98 ja põlevkivi loomulik kooslus) adapteerimiseks tehti Eesti põlevkiviga kaheksa edasikülvi värskesse kultiveerimiskeskonda. Eesti põlevkiviga tehtud edasikülvide alusel valiti välja sobivam sööde ning korraldati neid katseid lühema aja jooksul ka Jordaania põlevkiviga. Katsetes kasutatud karbonaatne-silikaatne Jordaania põlevkivi on pärit Attarat Um Ghudrani kihistust. Jordaania põlevkivi inokuleeriti Eesti põlevkivilt saadud 8. edasikülvi (339 katsepäeva) lõpuks kujunenud kooslusega PK 2A-8. Jordaania põlevkiviga tehtud katsete kestvuse (81 päeva) jooksul tehti kokku kolm edasikülvi värskesse kultiveerimiskeskonda.

### **Aeroobsete katsete proovide kogumine**

Katsete jooksul tehti kord nädalas võetud proovidest väljakülve mikroorganismide arvukuste (CFU/ml) määramiseks ning mõõdeti pH. pH mõõdeti indikaatorpaberi ribadega (Panpeha, pH 0-14). Proovide kogumise skeem on toodud joonisel 8. Eesti põlevkiviga katsetes määrati leostunud metallide sisaldus 8. edasikülvi lõpus ning Jordaania põlevkiviga katsetes 3. edasikülvi lõpus.



**Joonis 8.** Aeroobsete katsete proovivõtu skeem

### 3.1.1 Mikroorganismide arvukuse määramine

Elusrakkude arvukust saab määrata nii kaudselt kui ka otseselt. Kaudseks määramiseks kasutatakse väljakülvide meetodit ning otseseks määramiseks rakkude DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool)-ga värvimist.

**Arvukuse kaudne määramine**-Katse erinevatel ajahetkedel võeti sagedusega üks kord nädalas vedelfaasi proovid ning külvati need detsimaalsete lahjendustena R2A söötmega tassile. Lahjendused tehti vahemikus  $10^{-3}$  kuni  $10^{-8}$  kolmes paralleelses korduses ning kolooniaid loendati visuaalselt (joonis 7). Arvestades keskmist kolooniate arvu, lahjendusfaktorit ja külvimäära leiti elusrakkude arvukus CFU/ml. Kolooniate loendamine põhineb eeldusel, et ühest mikroorganismist kasvab välja üks silmaga nähtav koloonia. Lahjendusfaktor leitakse [32]:

$$\text{Lahjendusfaktor} = \frac{\text{proovi maht (ml) või kaal (g)} + \text{lahjendusvee hulk (ml)}}{\text{proovi maht (ml) või kaal (g)}} \quad (3.1.1)$$

Arvukust väljendatakse kolooniaid moodustavate ühikutena (CFU) 1 ml algproovi kohta. Arvukus leitakse [32]:

$$\text{Arvukus} \left( \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{kolooniate arv (CFU)} * \text{lahjendusfaktor}}{\text{külvimäär (ml)}} \quad (3.1.2)$$

**Arvukuse otsene määramine**- rakkude DAPI-ga värvimine. DAPI on mitteinterkalaarselt seonduv DNA-spetsiifiline värv, mis DNA-ga seondudes fluorestseerub siniselt [32]. DAPI-ga värvimine teostati 4. edasikülvi 244. katsepäeva proovidele (PK1A-4, PK1B-4, PK1C-4 ja

PK2A-4, PK2B-4, PK2C-4). DAPI-ga värvimine teostati 0,5 ml 0,5 µg/ml lahusega 6 minuti jooksul. Värvitud proove loendati fluorestsensmikroskoobi abil kasutades sinist filtrit  $\lambda=461$  nm.

**Generatsiooniaegade arvutamine.** Generatsiooniaeg on aeg, mis kulub mikroorganismide rakkude arvu kahekordistumiseks [32]. Generatsiooniajad arvutati Eesti põlevkivi katsete inokulumiga 98 inokuleeritud katsete mikroorganismidele (katsed PK1A ja PK2A). Generatsiooniaegade arv leiti valemi 3.1.3 alusel.

$$n = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) / \log(2) \quad (3.1.3)$$

kus N-elumus proovivõtu päeval, CFU/ml  
N<sub>0</sub>- elumus katse alguses, CFU/ml [30]

### 3.1.2 Metallide analüüs

Metallide sisaldused määras Päärn Paiste ICP-MS (ioonsidestatud plasma spektromeetria meetodil) Tartu Ülikooli geoloogia osakonnas ning Olga Pihl AAS (aatomabsorptsioon spektromeetria) meetodil TTÜ Põlevkivi Kompetentsi keskuses. ICP-MS meetodil võeti leostunud metallide analüüsiks katsest 1,5 ml proovi. Vedelfaasi eraldamiseks tsentrifuugiti proove 2 minutit kiirusel 13 000 pöör/minutis. 250 µl vedelfaasi pipeteeriti uude happega pestud epsi ning lisati sellele 25 µl HNO<sub>3</sub> (1:1). AAS meetodil võeti 10 ml proovi 15 ml katsutisse ning lisati lisati sellele 1 ml HNO<sub>3</sub> (1:1).

Kivimist leostunud metallide määramiseks proovis lahutati kogu proovi metallide sisaldusest katsetesse lisatud vastava söötme metallide sisaldus. Katsetes kasutatud töötlemata põlevkivi metallide sisalduse põhjal arvutati leostunud metallide saagis.

### 3.1.3 Elementanalüüs

Eesti põlevkiviga teostatud aeroobsetest katsetest 20. katsepäeval võetud proovide (PK1A, PK1B, PK1C ja PK2A, PK2B, PK2C) tahkele jäägile teostas Olga Pihl TTÜ Põlevkivi Kompetentsi keskuse Kohtla-Järve laboris elementanalüüsi. Elementkoostis C, H, N, O määrati elementanalüsaatoriga EVS-ISO 29541 ning üldväävli sisaldus S<sub>üld</sub> standardis KM44/VKFL:2016 kirjeldatud meetodil. Andmeid töötles Anne Menert.

### 3.2 Anaeroobsed katsed

Anaeroobsed katsed viidi läbi 300 ml 3-kaelaga pudelites, millest ühele on kinnitatud rõhuanduriga kork ehk rõhku mõõtev pea (Oxitop, WTW), teisest saab võtta vedelfaasi proovi ja kolmandast gaasifaasi proovi. Orgaanilise materjali anaeroobse lagunemise käigus vabanev biogaas tõstab hermeetiliselt suletud ja kalibreeritud Oxitop pudelites rõhku (joonis 9)



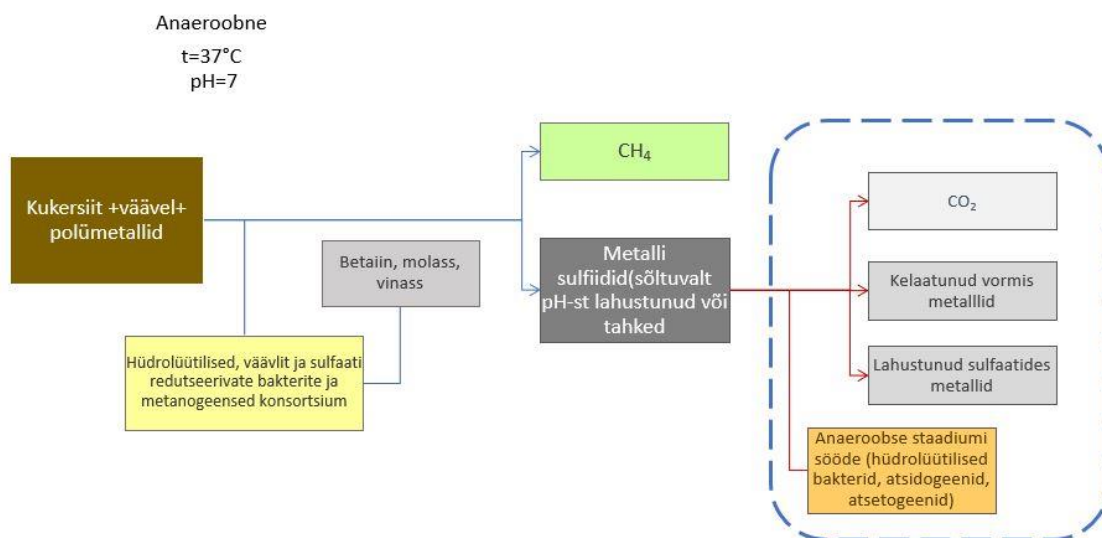
**Joonis 9.** Oxitop anaeroobsete katsete pudelid.

Proovipudelites saavutati anaeroobsus argooni läbipuhumisega katse alustamisel. Argooni kasutati, sest see on raskem kui katsepudeli gaasifaasis olev õhk ning seetõttu surub õhu pudelist välja. Lisaks on argoon inertgaas st ei reageeri teiste katse komponentidega. Kultiveerimiskeskkonnana kasutati vedelsöödet R2A, mis autoklaaviti koos pudelitega. Söötmelise süsinikuallikad, metanogeneesi substraadid (betaiin,  $\text{NaHCO}_3$ ) ja anaeroobse keskkonna tekitajad (tsüsteiin,  $\text{Na}_2\text{S}$ ) viidi söötmesse läbi  $0,2\ \mu\text{m}$  poorisuurusega filtri (Sartorius Minisart Syringe Filter). Toitekeskkonna pH katse alguses oli 7. Pudelisse lisatud põlevkivi lagunemisel vabaneb biogaas, mille rõhu muutus tuvastatakse rõhku mõõtva peaga ning andmed kantakse arvutisse andmehõive seadmega kord päevas.

#### **Inokulumid**

Katsete inokuleerimiseks kasutati  $-80^\circ\text{C}$  juures glütseroolis säilitatud kooslust 5A. Inokulume kasvatati ette 4 päeva anaeroobselt keermega korgiga katseklaasis vedelas R2A söötmes temperatuuril  $37^\circ\text{C}$  termostateerivas loksutis ning lisati katse käivitamisel Oxitop-pudelitesse. Vedelasse inokulumi ettekasvatamise söötmesse lisati samuti betaiini, tsüsteiini,  $\text{Na}_2\text{S}$  ja  $\text{NaHCO}_3$ . Anaeroobsus tagati argooni lisamisega. Anaeroobsete katsete skeem on toodud joonisel 10.





**Joonis 10.** Anaeroobsete katsete skeem (punktiiriga osa katsetamine on kavas edaspidi)

Kokku käivitati korraga 9 katset: kolme pudelisse lisati põhikatsed – põlevkivi ja inokulum; kolme ainult inokulum (söötme mõju arvestamiseks gaasitekk) ja kolme ainult põlevkivi – inokulum mõju eristamiseks põlevkivi loomuliku koosluse toimest. Kõikides katsetes kasutati 150 ml R2A vedelsöödet. Enne katse käivitamist juhiti anaeroobuse saavutamiseks kõikidesse pudelitesse 5 minuti jooksul Ar. Kultiveerimiskeskonnaga segamiseks ja sobiva temperatuuri säilitamiseks viidi katseid läbi termostateeritavas loksutis (t=37°C loksutis, 100 pööret/min.)

### 3.2.1 Rõhu tõus

Oxitop pea mõõdab rõhku hektopaskalites (1 hPa = 102,1 Pa = 1 mbar). Rõhku muutusest sõltuvalt arvutatakse vabanenud gaasihulk

$$pV = nRT \quad (3.2.1)$$

p- gaasirõhk, N/m<sup>2</sup> või hPa

V- gaasi ruumala, m<sup>3</sup>

R- universaalne gaasikontant R=8,314 J/mol\*K

T- gaasi absoluuttemperatuur, K

n- moolide arv, mol. n=1 vastab 22,4 l gaasile normaaltingimustel

Oxitop andmehõive seadme toorikfai andmetest saab arvutada reaktoris oleva kumulatiivse rõhu (hPa)

$$P_{\text{sum}, t} = P_{\text{sum}, t-1} + P_t - P_{t-1}, \quad (3.2.2)$$

P<sub>sum, t-1</sub>- eelmise katsepunkti kogurõhk, hPa

P<sub>t</sub>- praeguse katsehetke rõhk, hPa

P<sub>t-1</sub>- rõhu hetkeväärtus katse eelnevas punktis, hPa

Seejärel saab leida biogaasi kumulatiivse hulga millimoolides

$$n_{biogaas} = \frac{P_{biogaas} \cdot V_{biogaas}}{R \cdot T} \quad (3.2.3)$$

$P_{biogaas}$ - biogaasi rõhk reaktoris, hPa

$V_{biogaas}$ - biogaasi ruumala reaktoris, m<sup>3</sup>

R- universaalne gaasi konstant, m<sup>3</sup>hPa/ (K\*mol)

T- temperatuur, K

Ka inokulumis endas on komponente, mis lagunevad biogaasiks ning annavad seetõttu näiliselt suurema biogaasi tootlikkuse. Inokulumist põhjustatud biogaasi tootlikkus lahutatakse põlevkivi ja inokulumiga saadud biogaasi tootlikusest.

Üksnes substraadist eraldunud biogaasi kumulatiivne kogus millimoolides leitakse analoogselt.

$$n_{subs} = n_{biogaas} - n_{inok} * \frac{m_{inok, segus}}{m_{inok}} \quad (3.2.4)$$

$n_{biogaas}$ - substraadi ja inokulumi lagunemise käigus tekkinud biogaas, mmol

$n_{inok}$ - inokulumi lagunemise käigus tekkinud biogaas, mmol

$m_{inok, segus}$ - lisatud inokulumi hulk, g

$m_{inok}$ - inokulumi sisaldus tühikatses, g

Substraadi lagundamisel eraldunud biogaasi kumulatiivne kogus orgaanilise süsiniku massi kohta (mmol/ OS)

$$n_{subs/OC} = \frac{n_{subs}}{m_{subs} * \frac{KA\% * OC\%}{100\% * 100\%}} \quad (3.2.5)$$

$n_{subs}$ -substraadi lagunemise käigus kumulatiivne biogaasi kogus, mmol

$m_{subs}$ - substraadi mass, g

KA%- substraadi kuivaine sisaldus, %

OC%- substraadi orgaanilise süsiniku sisaldus, %

[64-66]

### 3.2.2 Gaasiproovid

Gaaskoostise määras Kaja Orupõld Eesti Maaülikoolis gaaskromatograafia Varian Inc., Model CP-4900 (metaani määramispiirkond 1-100%). Varian Inc., Model CP-4900 on varustatud 2 kolonniga: Molsieve 5A Backflush kuumutatud kolonn (20 m x 0.53 mm), kus kandjagaasina kasutatakse Ar ning PoraPLOT U kuumutatud kolonn (10 m x 0.53 mm), kus kandjagaasina kasutatakse He. Esimese kolonni sisestustemperatuur oli 110°C, kolonnitemperatuur 120°C ja rõhk 50 Psi. Teise kolonni sisestustemperatuur oli 110°C, kolonnitemperatuur 150°C ja rõhk 22 Psi. [67]

### 3.2.3 Anaeroobse töötamise mõju hindamine skaneeriva elektronmikroskoobiga

Skaneeriv elektronmikroskoop (SEM) on mikroskoop, mis loob kujutise uuritavat proovi suure energiaga elektronikiire abil skaneerides [68].

SEMi kasutati, et visuaalselt hinnata loomuliku ja 5A koosluse biofilmi koosluste erinevusi Eesti põlevkivi pinnal. SEM fotode tegemiseks sobivate proovikehade saamiseks riputati põlevkivitükk (2x1x1 cm) Oxitop pudeli külge kinnitatud tamiili abil vedelsöötmesse R2A (sisaldas ka betaiini, tsüsteiini,  $\text{Na}_2\text{S}$  ja  $\text{NaHCO}_3$ ). Paralleelselt käivitati anaeroobne katse kahes pudelis, millest ühte lisati kooslust 5A ja teise mitte. Söötmes rippuva kivimiga pudeleid hoiti 30 päeva termostateeritavas loksutis (37°C juures, 100 pööret minutis). Selle aja jooksul mõõdeti rõhumuutust, et hinnata biogaasi teket. Katse lõppedes fikseeriti kivimitükkidel olev biofilm 4% glutaaraldehüüdi ja 1-kordse fosfaatpuhvri (PBS) lahusega 24 tundi 4°C juures. Peale fikseerimist dehüdreeriti proovid astmeliselt etanooli lahusega (25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ja 96%) ning seejärel viidi proovid Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Arukate materjalide ja süsteemide laborisse, kus teostati ülekritiline süsinikdioksiidi ekstraktsioon (Quorum Technologies Polaron Critical Point Dryer E3100, Lauda proline RP 1845). Ekstraktsiooni käigus vahetati etanool vedela süsinikdioksiidi vastu ning seejärel kuivatati proovid üle ülekritilise punkti vastavalt lisas 2 väljatoodud juhendile. Peale ülekritilist ekstraktsiooni kinnitati kuivatatud proovid elektritjuhtiva teibiga (Elpox 15) SEM alusele ja kaeti magnetron pihustusega 7,5 nm paksuse kullakihi (Leica EM ACE600), et muuta proovide pind elektrit juhtivaks. Seejärel karakteriseeriti proove SEM ja energia dispersiivse röntgen spektroskoopia (EDX) abil (Hitachi TM 3000).

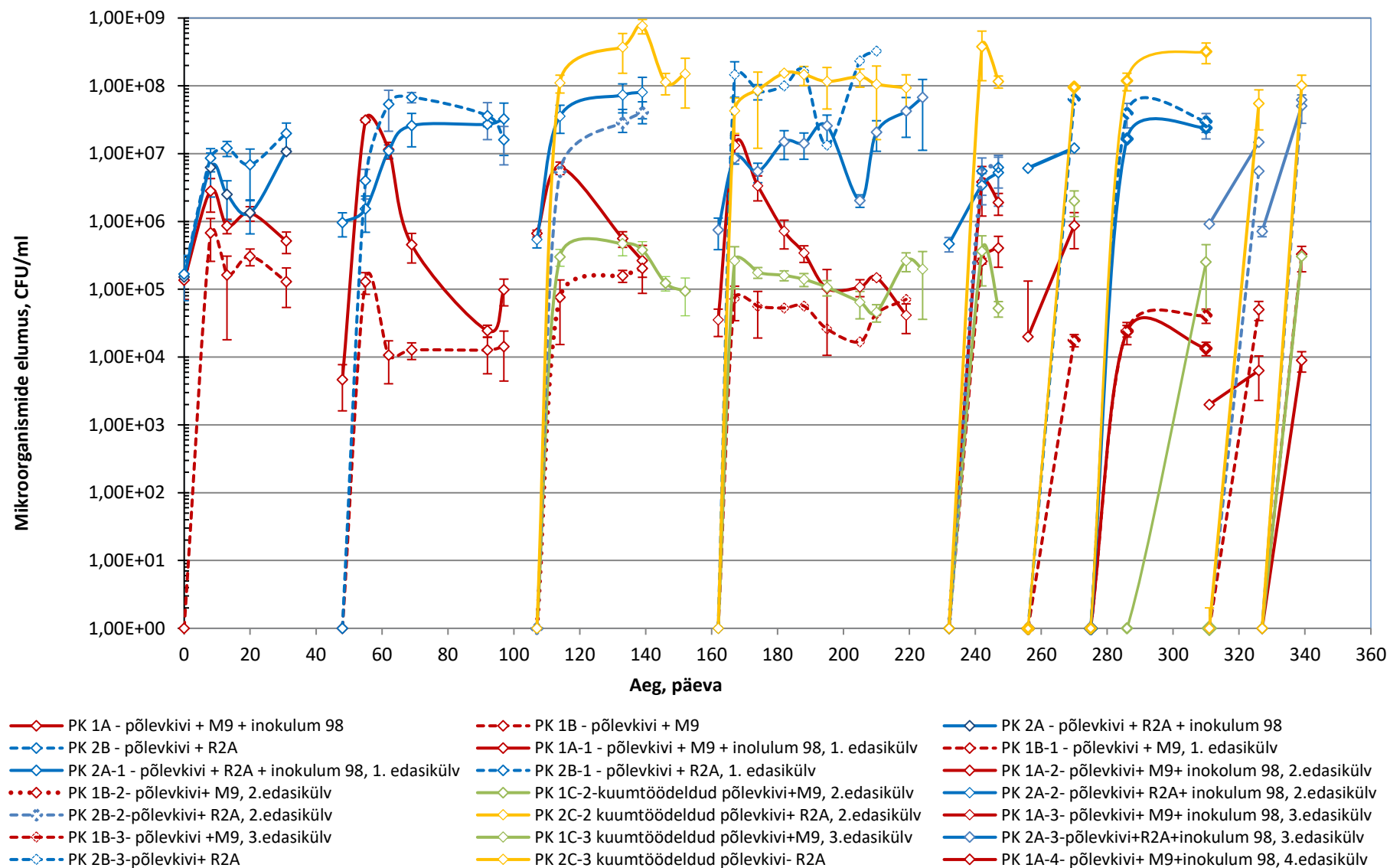
## 4. Tulemused

### 4.1 Aeroobsed adapteerimiskatsed

#### 4.1.1 Mikroorganismide arvukus

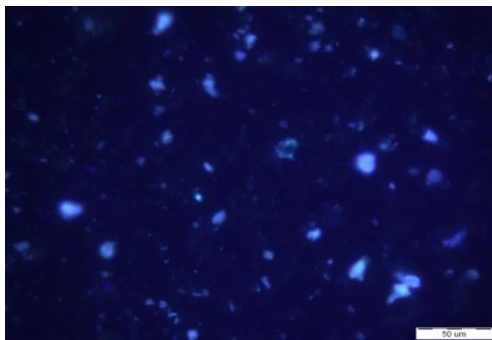
Aeroobseid põlevkivi katseid viidi läbi söötmetega M9 ja R2A. Aeroobseid heterotroofe kultiveerides tekivad happelised metaboliidid, mis ilma söötmetes sisalduva puhvrita viiksid pH alla. Aeroobsed adapteerimiskatsed viidi läbi joonise 6 alusel ning proove võeti 5-10 päeva tagant joonisel 8 kujutatud skeemi alusel. Eesti põlevkivi mikroorganismide arvukusi on näha joonisel 11. Alates esimesest kultiveerimisest on näha, et söötmega R2A (katsed PK2A, PK2B, PK2C) saavutatakse kõrgem mikroorganismide arvukus, kui söötmega M9 (katsed PK1A, PK1B, PK1C), sõltumata sellest kas inokulum on lisatud või ei. Näiteks katses PK2A (põlevkivi + R2A + inokulum 98) on arvukus 31. katsepäevaks  $10^7$ , aga katses PK1A (põlevkivi + M9 + inokulum 98) korral veidi alla  $10^6$  CFU/ml. M9 söötmetega katsete korral (PK1A, PK1B ja PK1C ning nende edasikülvid) on näha, et arvukus tõuseb edasikülvi esimese nädala jooksul vähemalt kümnekordselt, kuid peale seda langeb arvukus oluliselt. Söötmega M9 kultiveerimiskatsetes (katsed PK1A) oli generatsiooniaeg 1,67 päeva ja söötmega R2A kultiveerimiskatsetes 2,37 päeva (lisa 3). M9 söötmel toimub mikroorganismide kasv katse alguses kiiremini kui R2A söötmega – nt katses PK1A-3 on arvukus 5 päeva pärast edasikülvi (katsepäev 167) tõusnud  $10^4$  kuni  $10^7$  CFU/ml, kuid 52 päeva möödudes on arvukus uuesti langenud.

Alates 2. edasikülvist (114. katsepäev) hakkasid mikroorganismid kasvama ka kuumtöödeldud põlevkiviga katsetes (joonis 11, katsed PK1C-2 ja PK2C-2). Nii söötmega R2A kui ka M9 suurenes arvukus  $10^3$  kuni  $10^5$  korda. Esialgselt arvukuselt  $10^3$  CFU/ml (detekteerimise lävend tilgakülvil) tõusis elumus 7. päeva jooksul kuni  $10^8$  CFU/ml (sööde R2A). Samuti nagu kuumtöötlemata põlevkiviga katsete korral saadi söötmega R2A kõigis edasikülvides ka kuumtöödeldud põlevkiviga kõrgemaid arvukusi kui söötmega M9. Alates 114. katsepäevast olid R2A söötmega kuumtöödeldud põlevkivi katsete arvukused kõige suuremad ( $10^8$  CFU/ml). Mõnedes mineraloogia-alastes artiklites märgitakse, et kuumutamine võib pigem parandada orgaanilise aine kättesaadavust mikroorganismidele, kuigi enamasti on eesmärk saada aseptiline (mikroorganismide vaba) proov [69]. Keskkonna biotehnoloogias on termiline töötlus levinud võtte tõrksate substraatide (nt reovee sete) eelkäitluseks [70]. Alates 4. edasikülvist (katsepäev 232) tehti edasikülvid statsionaarse faasi alguses, et soodustada mikroorganismide kiiremat kasvu. Üldiselt saavutati söötmega R2A kõrgemaid mikroorganismide arvukusi, mistõttu tehti järgnevad kultiveerimised selle söötmega.

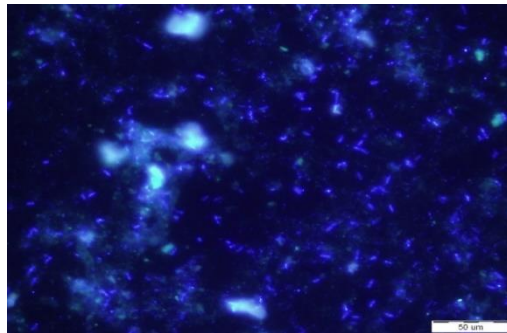


**Joonis 11.** Eesti põlevkivi aeroobsete katsete mikroorganismide elumus. Edasikülvide 5.-8. tähistused analoogilised edasikülvide 2.-4. edasikülvide tähistustega.

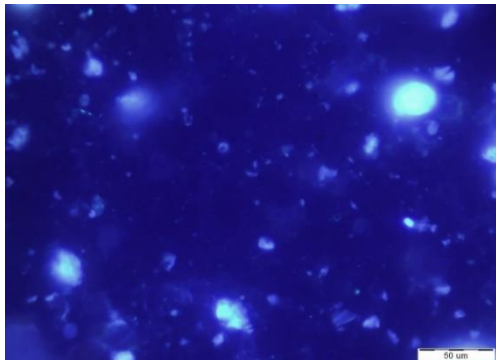
Eesti põlevkivi aeroobsete katsete mikroorganismide arvukuse otseseks määramiseks teostati DAPI-ga (4,6-diamidino-2-fenüülindool) värvimine 244. katsepäeva proovidele (joonis 12). Joonisel 12 on näha, et söötmega R2A proovidel (PK2A-4, PK2B-4 ja PK2C-4) on fluoreseeruvaid piirkondi rohkem, kusjuures osaliselt on värvunud ka muu orgaaniline materjal. DAPI-värvimise tulemused langevad kokku väljakülvide meetodil saadud tulemustega, sest mõlemal puhul on R2A söötmel mikroorganismide arvukus suurem. DAPI-ga värvimisel polnud mikroorganismid piisavalt selgesti eristatavad, mistõttu sobib kivimites olevate mikroorganismide arvukuse määramiseks paremini väljakülvide meetod .



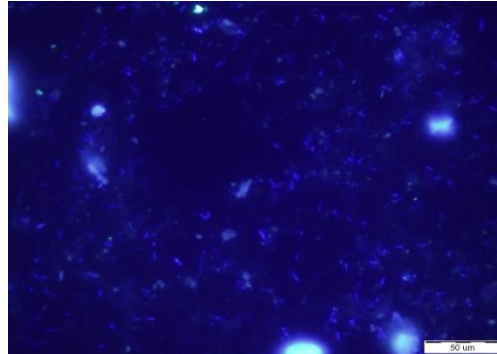
PK1A-4 Eesti põlevkivi+ M9+ inokulum 98, 4.edasikülv 30x lahjendus



PK2A-4 Eesti põlevkivi+ R2A+ inokulum 98, 4.edasikülv 30x lahjendus



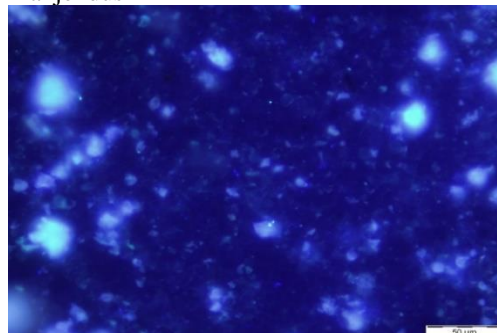
PK1B-4 Eesti põlevkivi+ M9, 4.edasikülv 30x lahjendus



PK2B-4 Eesti põlevkivi+ R2A, 4.edasikülv 30x lahjendus



PK1C-4 kuumtöödeldud Eesti põlevkivi+ M9, 4.edasikülv 30x lahjendus

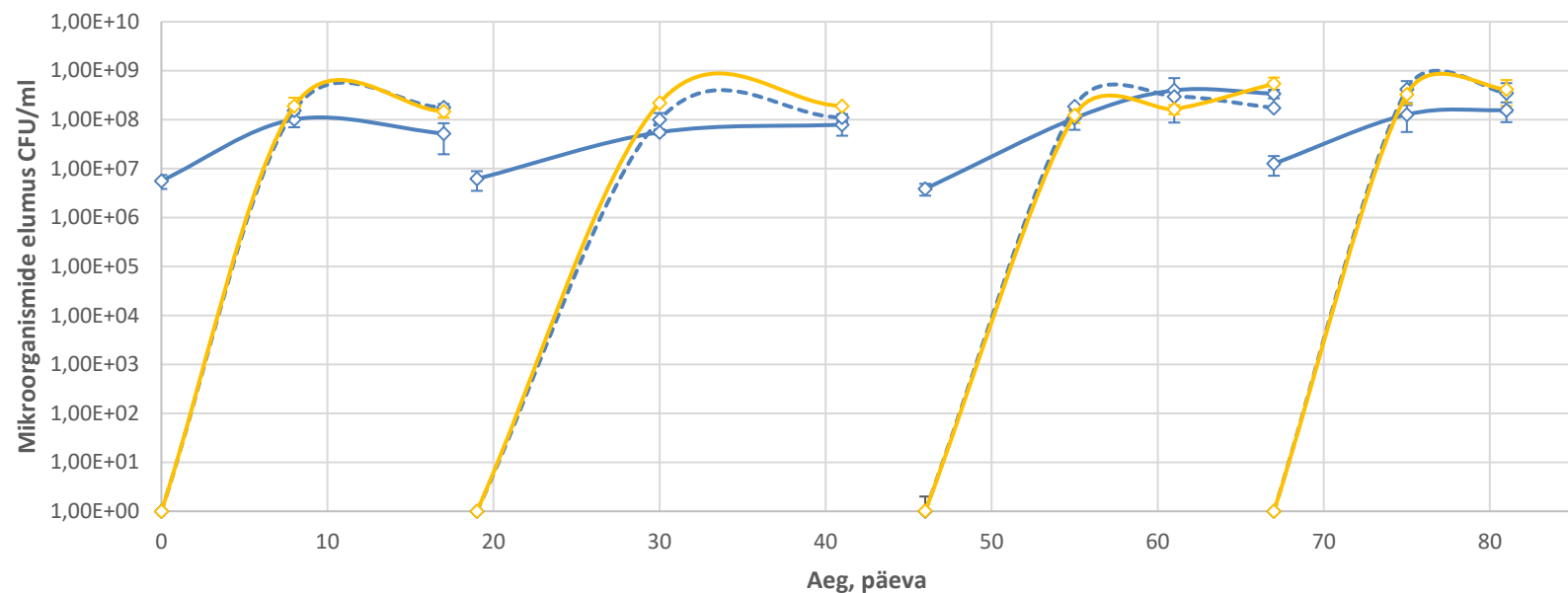


PK2C-4 kuumtöödeldud Eesti põlevkivi+ R2A, 4.edasikülv 30x lahjendus

**Joonis 12.** Eesti põlevkivi DAPI-ga värvitud preparaadid fluorestsentsmikroskoobi all, 30x lahjendus

Eelnevate katsete alusel valiti Jordaania põlevkivi adapteerimiskatseteks sööde R2A. Katsed Jordaania põlevkiviga kestsid 81 päeva, mille jooksul tehti 3 edasikülvi (joonis 13).

Katse käivitamisel on Eesti põlevkiviga aeroobselt adapteeritud kooslusega PK 2A-8 inokuleeritud katses kohe algselt arvukus kõrge ( $10^8$  CFU/ml), kuid see ei muutunud oluliselt edasikülvide jooksul. Jordaania põlevkivi loomulik kooslus käitus sarnaselt olenemata sellest, kas kivimit oli enne kuumtöödeldud või mitte. Viimase edasikülvi lõpuks saavutati arvukus  $10^9$  CFU/ml. Seega inokulumi lisamine mikroorganismide arvukust ei suurendanud.



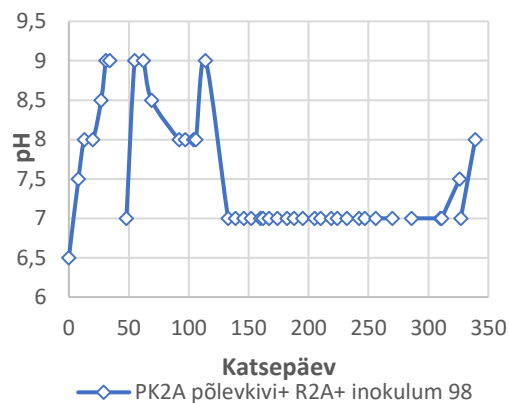
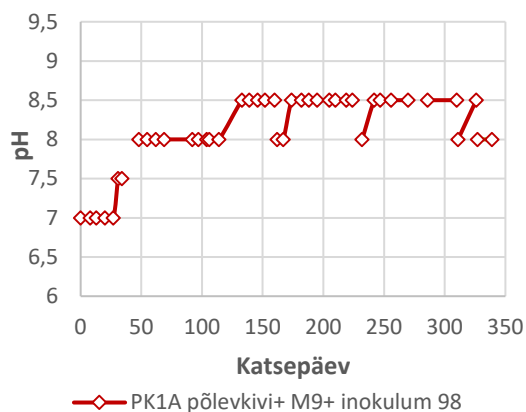
- ◇— J-PK-2A Jordaania põlevkivi+ R2A+ inokulum PK 2C-8
- ◇— J-PK-2C kuumtöödeldud Jordaania põlevkivi+ R2A
- -◇- - J-PK-2B-1 Jordaania põlevkivi+ R2A, 1.edasikülv
- ◇— J-PK2A-2 Jordaania põlevkivi+ R2A+ inokulum 99, 2.edasikülv
- ◇— J-PK2C-2 kuumtöödeldud Jordaania põlevkivi+ R2A, 2.edasikülv
- -◇- - J-PK 2B-3 Jordaania põlevkivi+ R2A, 3.edasikülv
- -◇- - J-PK-2B Jordaania põlevkivi+ R2A
- ◇— J-PK-2A-1 Jordaania põlevkivi+ R2A+ inokulum PK 2C-8, 1.edasikülv
- ◇— J-PK-2C-1 kuumtöödeldud Jordaania põlevkivi+ R2A, 1.edasikülv
- -◇- - J-PK2B-2 Jordaania põlevkivi+ R2A, 2.edasikülv
- ◇— J-PK 2A-3 Jordaania põlevkivi+R2A+ inokulum 99, 3.edasikülv
- ◇— J-PK 2C-3 kuumtöödeldud Jordaania põlevkivi+ R2A, 3.edasikülv

**Joonis 13.** Mikroorganismide elumus aeroobsetes kultiveerimiskatsetes Jordaania põlevkiviga



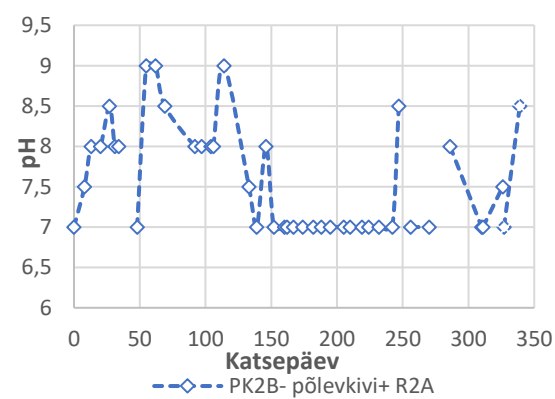
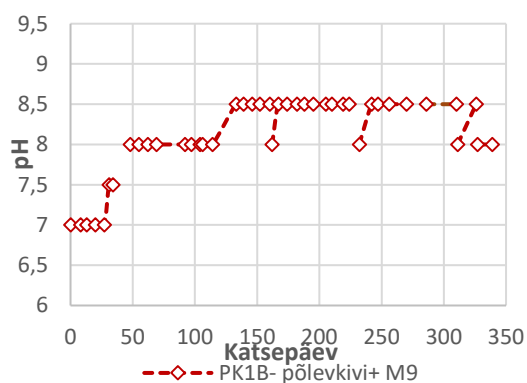
#### 4.1.2 pH

pH mõõtmiste tulemused Eesti põlevkiviga aeroobsetes kultiveerimiskates on esitatud joonisel 14. pH tõusis mõlema söötme puhul väärtuselt pH 7 kuni väärtuseni pH 8,5 (M9) või pH 9 (R2A). Vee kokkupuutel kaltsiumkarbonaadiga tõuseb vee pH, sest avatud süsteemis tahke  $\text{CaCO}_3$ –vesi–õhk  $\text{CO}_2$  osarõhul  $P(\text{CO}_2)_G = 390$  ppm on temperatuuril 25 °C tasakaaluline pH väärtus võrdne 8,2-ga [71]. Väiksem pH tõus söötmega M9 katstes võib olla seotud sellega, et M9 sööde on kolm korda tugevama puhverdusvõimega kui sööde R2A. pH langus söötmega R2A katsetes 150. katsepäeval võib olla seotud mikroorganismide poolt toodetud happeliste metaboliitide tekkega. (joonis 11)



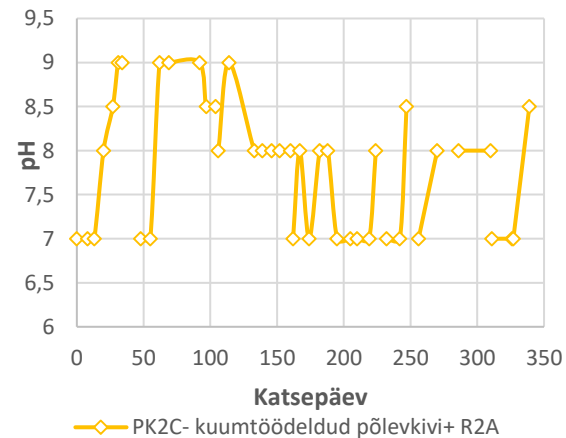
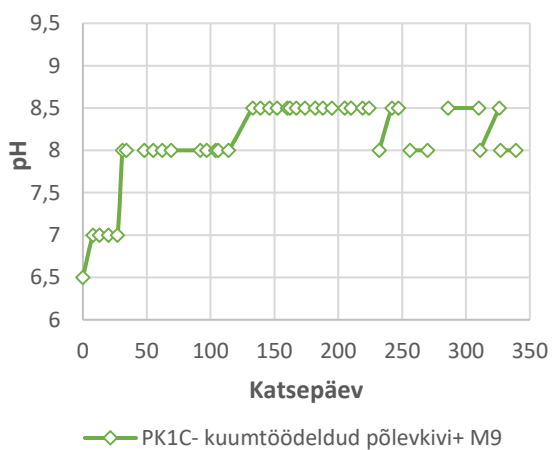
PK1A- põlevkivi+ M9+ inokulum 98

PK2A- põlevkivi+ R2A+ inokulum 98



PK1B- põlevkivi+ M9

PK2B- põlevkivi+ R2A

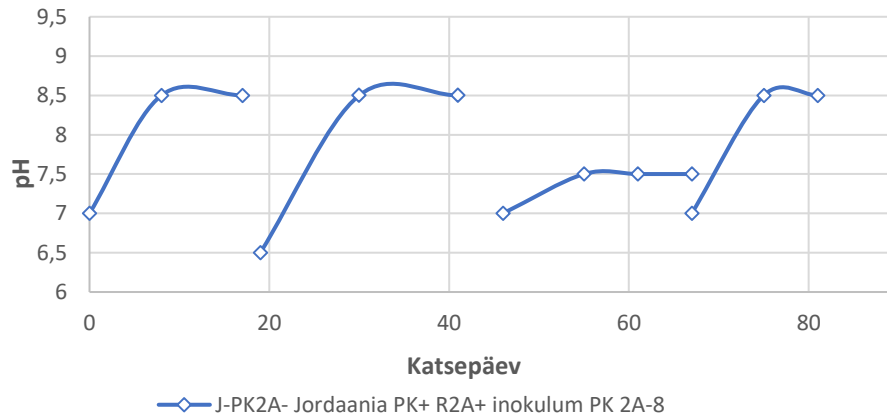


PK1C- kuumtöödeldud põlevkivi+ M9

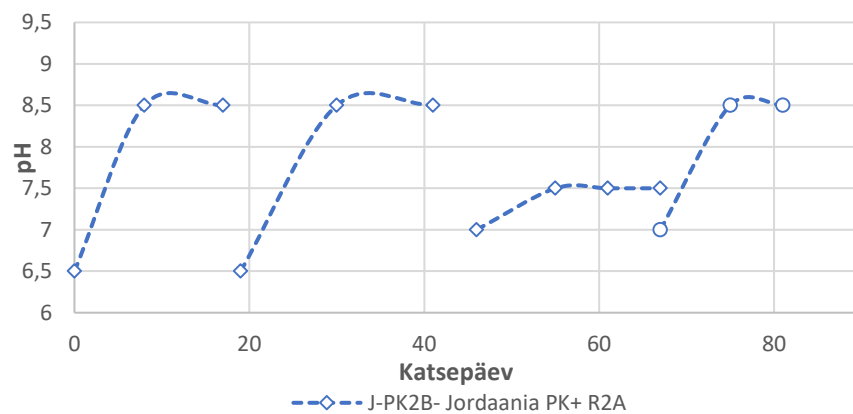
PK2C-kuumtöödeldud põlevkivi+ R2A

**Joonis 14.** pH muutus kultiveerimiskatsetes Eesti põlevkiviga 339 katsepäeva jooksul

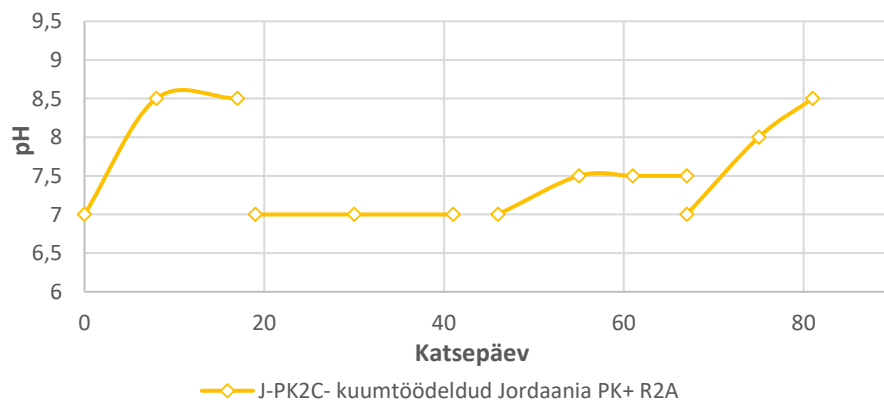
Sarnaselt aeroobsetele katsetele Eesti põlevkiviga mõõdeti pH-d ka katsetes Jordaania põlevkiviga (joonis 15). Sarnaselt Eesti põlevkivi katsetele tõusis ka Jordaania põlevkivi katsetes pH esimese 8 katsepäeva jooksul 6,5-7-lt 8,5-le.



J-PK2A - Jordaania põlevkivi+ R2A+ inokulum PK2A-8



J-PK2B - Jordaania põlevkivi+ R2A

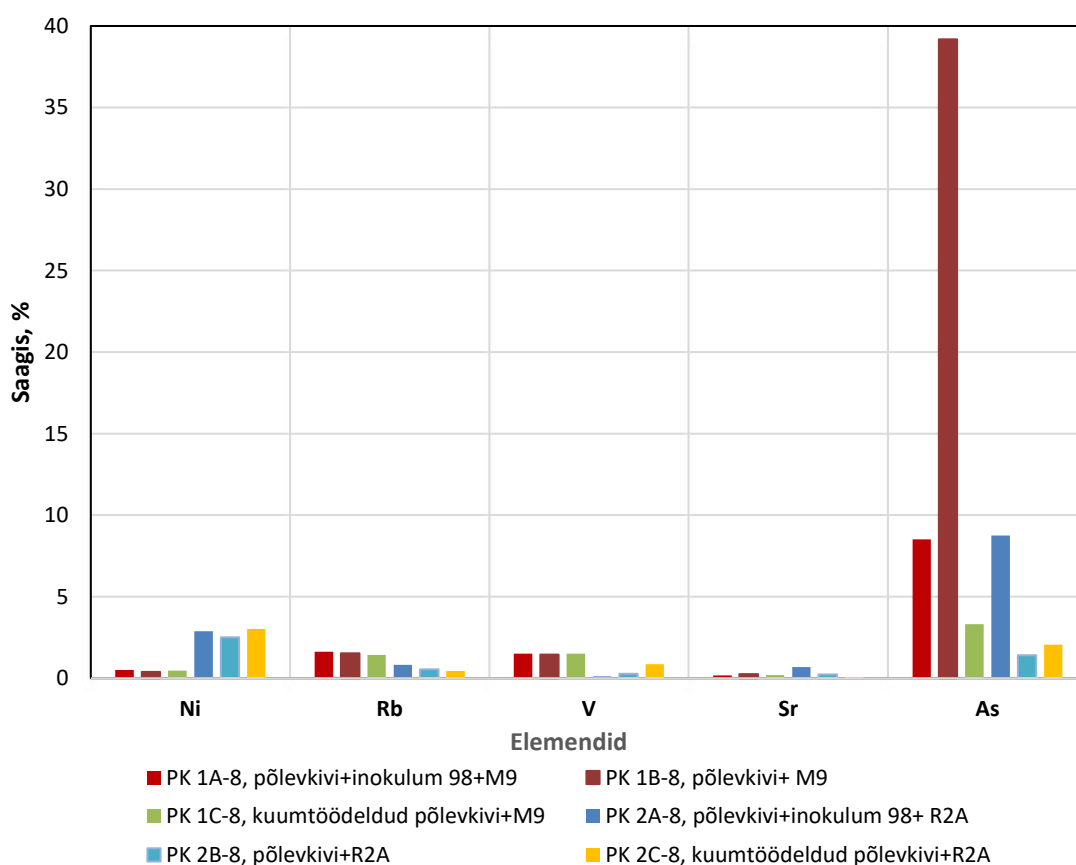


J-PK2C - kuumtöödeldud Jordaania põlevkivi+ R2A

**Joonis 15.** pH muutus kultiveerimiskatsetes Jordaania põlevkiviga 339 katsepäeva jooksul

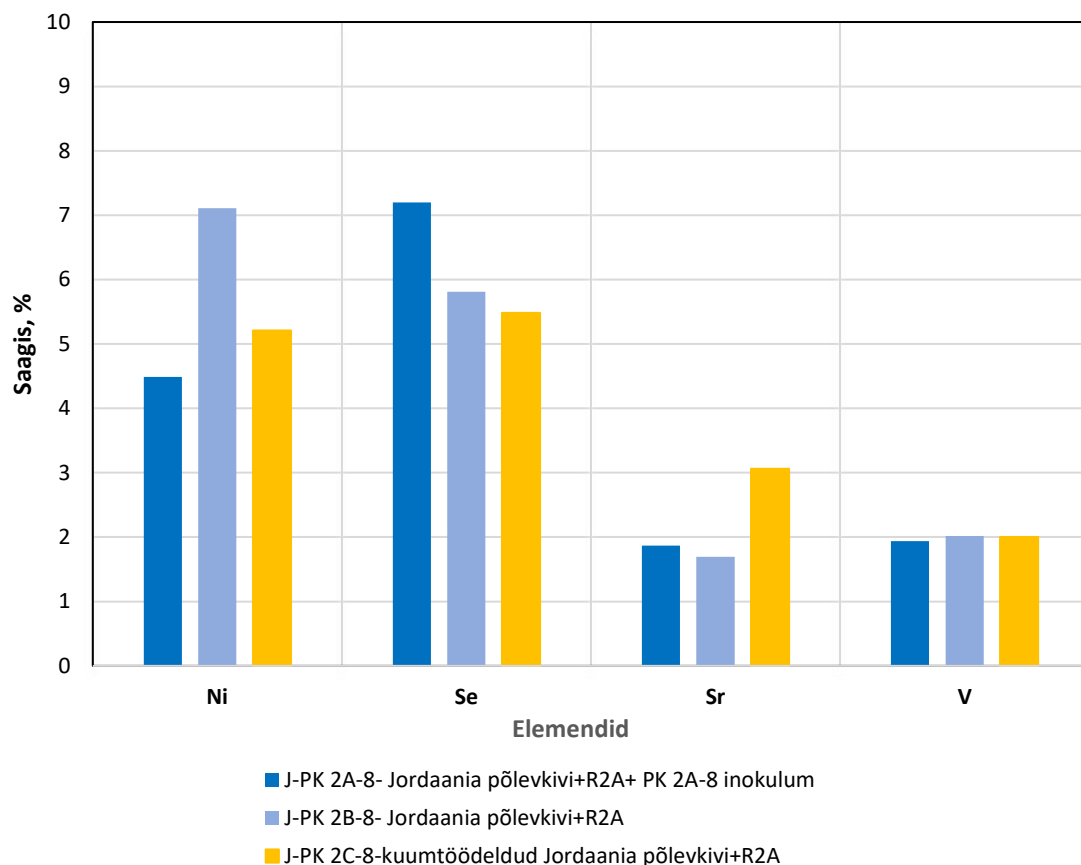
#### 4.1.3 Metallide saagis

Eesti põlevkivist leostunud metallide sisaldus määrati katse lõpus (336.katsepäev, joonis 16). Mikroelementide sisaldus töötlemata põlevkivi proovis võeti käsiraamatust „Harakteristika garjutših slantsev“ [72] ja makroelementide sisaldus määrati TTÜs Põlevkivi Kompetentsi keskuses AAS meetodil. Mikroelementidest leostus kõige rohkem arseen (saagis 39%, sööde M9, põlevkivi loomulik kooslus). Kooslusega PK 2A-8 inokuleeritud põlevkivi proovidest söötmega R2A leostus 8,76% arseeni ning kooslusega PK1A-8 söötmega M9 8,51% arseeni. Vaadates ka kuumtöödeldud põlevkiviga katsete tulemusi, on näha et M9 söötmega katsetes leostub arseen paremini kui R2A söötmega katsetes. Kõrge arseeni saagise tõttu saaks seda kooslust kasutada bioremediatsioonis ning protsessides, kus seadmed on arseeni suhtes tundlikud [26]. Ülejäänud mikroelementide leostumise saagised olid vahemikus 1-3%. Mikroelementide leostumise saagis ei sõltu inokulumi lisamisest. Makroelementide saagis on toodud lisas 4. Makroelementidest leostus enim K (saagis 23,5%, sööde M9). Ka makroelementide puhul ei avaldanud inokulumi lisamine leostumisele mõju.



**Joonis 16.** Eesti põlevkivist aeroobselt leostunud metallide saagised.

Metalliproovid kultiveerimiskatsetest Jordaania põlevkiviga võeti 3.edasikülvi lõpus ehk 81. katsepäeval. Saagised on esitatud joonisel 17. Metallide sisaldus Jordaania põlevkivis on märkimisväärselt suurem kui Eesti põlevkivis. Võrreldes Eesti põlevkivist leostunud mikroelementide nimekirja ja saagistega leostub Jordaania põlevkivist mikroorganismide kaasabil mikroelemente tunduvalt rohkem ja suurema saagisega. Kõige paremini leostuvad Ni ja Se. Inokulumi lisamisel on väike mõju Se leostumisele, nt inokulumi lisamine tõstab saagikuse 7,2%-ni, võrreldes 5,80%-ga inokuleerimata katsete puhul.



**Joonis 17.** Jordaania põlevkivist leostunud mikroelementide saagis

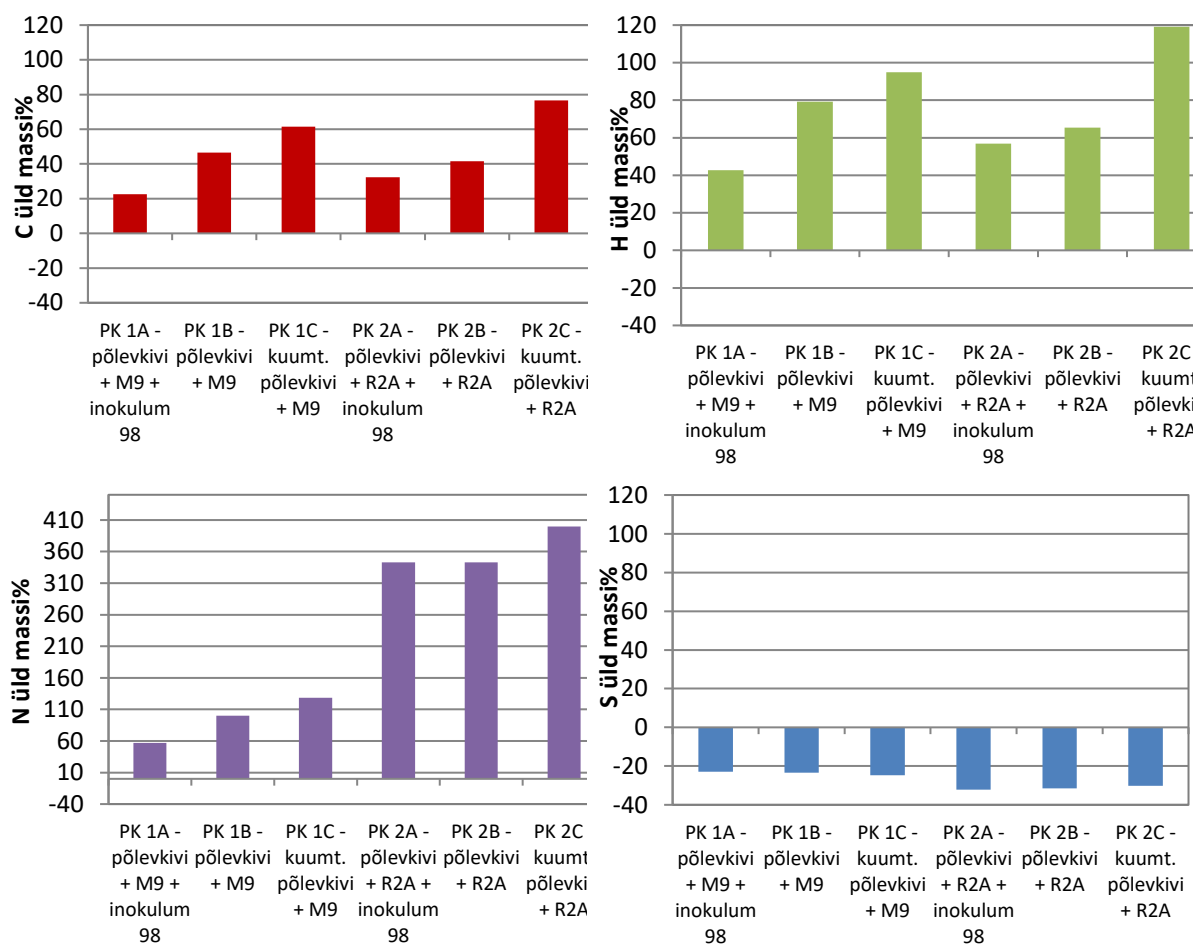
#### 4.1.4 Elementanalüüs

Elementanalüüs teostati kultiveerimiskatsete tahkele jäägile. Leostatud proovide tahkes jäägis vähenes väävlisisaldus, kuid süsiniku-, vesiniku- ja lämmastiksisaldused seevastu suurenesid (joonis 18). Võrreldes töötlemata põlevkiviga vähenes üldväävli sisaldus põlevkivis, mida oli kultiveeritud M9 söötmega 23-25% ning R2A söötmega töötlemisel 30-32%. Seevastu üldsüsiniku sisaldus mikrobioloogiliselt töödeldud põlevkivi tahkes jäägis kasvas –söötmega M9 22-61% ja söötmega R2A-ga 32-76%. Üldsüsiniku sisalduse kasv võib olla seotud

bakterirakkude biomassi kogunemisega tahkesse jääki. Suurenes ka vesiniku sisaldus. Argilliidilt eraldatud koosluse (inokulum 98) olemasolul katsetes (PK1A ja PK2A) suurenes üldsüsiniku sisaldus tahkes jäägis umbes sama palju kui vähenes üldväävli sisaldus. Kõige rohkem suurenes proovides lämmastikusisaldus, söötme M9 puhul 52-129%, söötme R2A puhul koguni 3,4-4 korda.

Suurimad C-, H- ja N-sisalduse muutused toimusid kultiveerimiskatsetes põlevkiviga, milles kivimit oli eelnevalt kuumtöödeldud (katsed PK1C ja PK2C).

eelnevalt kuumtöödeldud (PK1C ja PK2C).

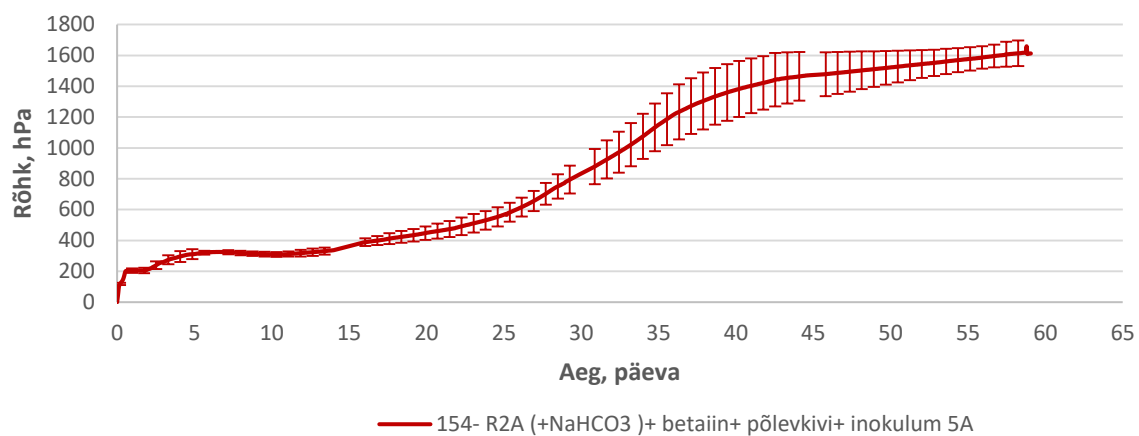


**Joonis 18.** Elementide (C, H, N, S<sub>üld</sub>) leostumine kultiveerimiskatsetes Eesti põlevkiviga.

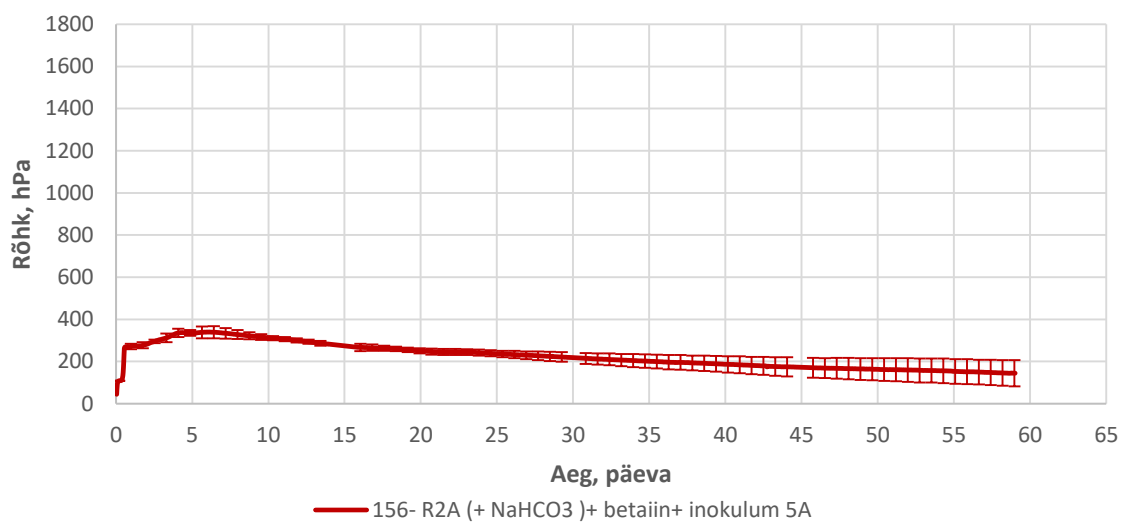
## 4.2 Anaeroobne kultiveerimiskatse

### 4.2.1 Rõhu muutus

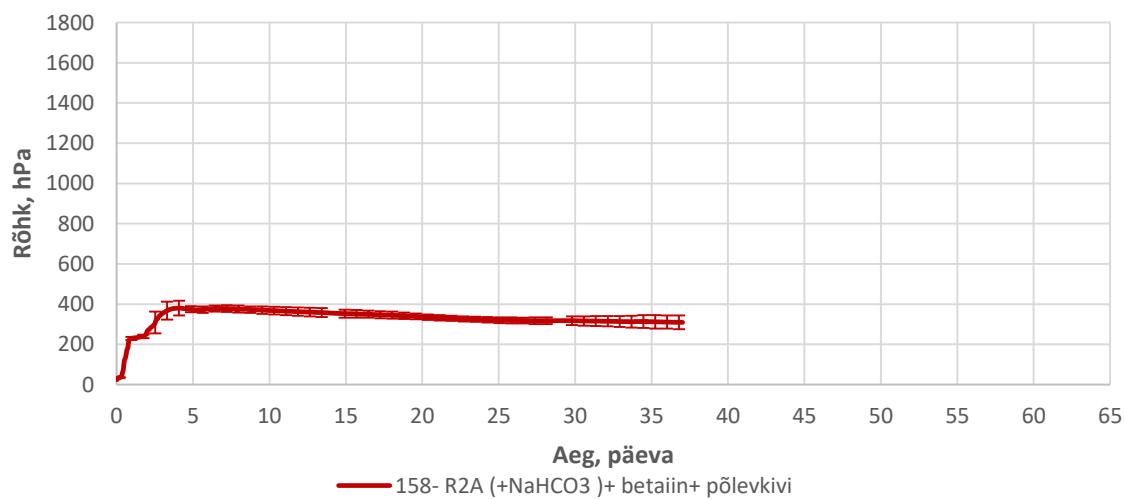
Põlevkivi anaeroobse töötlemise tulemusena arvutati igapäevaselt võetud rõhuandmete põhjal biogeense gaasi eraldumine mmol/g põlevkivi kohta (joonis 19). Biogeenne gaas hakkas intensiivselt eralduma alates 15. katsepäevast põlevkivi ja inokulumiga 5A katsetes. 0-14 katsepäeval toimus inokulumi adapteerumine ning mikroorganismid ei kasutanud intensiivselt põlevkivist sisalduvat süsinikku energiaallikana. Üksnes inokulumi ja põlevkiviga kultiveerimiskatsetes ei toimu biogaasi eraldumist (rõhugraafik langeb). See annab kinnitust, et biogaasi eraldamiseks on vaja nii orgaanikarikast substraati kui ka metanogeenseid mikroorganisme sisaldavat kooslust. Biogeenset gaasi eraldus 5,77 mmol/g põlevkivi kohta (lisa 5).



Katse 154- R2A+ põlevkivi+ inokulum 5A



Katse 156- R2A+ inokulum 5A



Katse 158- R2A+ põlevkivi

**Joonis 19.** Rõhumuutus anaeroobsetes kultiveerimiskatsetes Eesti põlevkiviga.



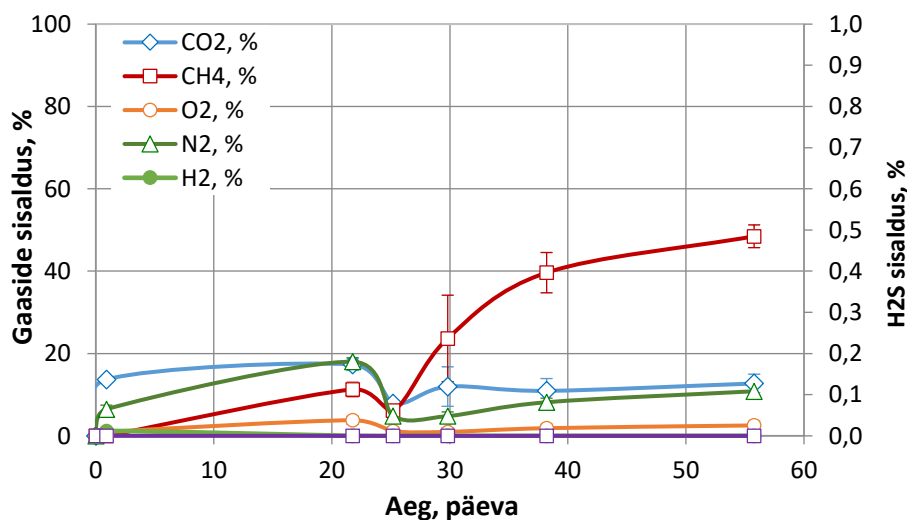
#### 4.2.2 Gaasianalüüs

Gaasifaasi koostis anaeroobsetes kultiveerimiskatsetes analüüsiti gaaskromatograafia. Gaasifaasi proovid võeti siis, kui rõhuanduriga registreeriti rõhutõus. Biogaasi eraldus nendest katsetest, millesse oli lisatud inokulumi 5A ja 1% põlevkivi. Tänu gaasi eraldumisele oli võimalik mõõta ka selle koostist (joonis 20).

Gaasikoostise graafikult on näha, et katse alguses esimese 22 katsepäeva jooksul sisaldas gaasifaas põhiliselt  $\text{CO}_2$  ja  $\text{N}_2$ , mis viitab orgaanilise materjali lagunemisele. Pärast 22. katsepäeva  $\text{CO}_2$  sisaldus stabiliseerus kuni katse lõpuni (kuni 14% gaasifaasist),  $\text{N}_2$  sisaldus jäi 8,9-12,9% juurde ning  $\text{O}_2$  sisaldus 0-2,9%.

Alates 22. katsepäevast hakkas gaaside koostises vähenema  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  ja  $\text{O}_2$  sisaldus ning domineerima hakkas  $\text{CH}_4$ . 36. katsepäevaks moodustas  $\text{CH}_4$  48,5% eraldunud gaasist. Metaani eraldumine muutus väga intensiivseks 22- 25 katsepäeva möödudes. See langeb kokku ka rõhugraafikutega, mille puhul on samuti alguses lag-faas, mille käigus intensiivset gaasi eraldumist ega sellega kaasnevat rõhutõusu ei registreeritud (joonis 19).

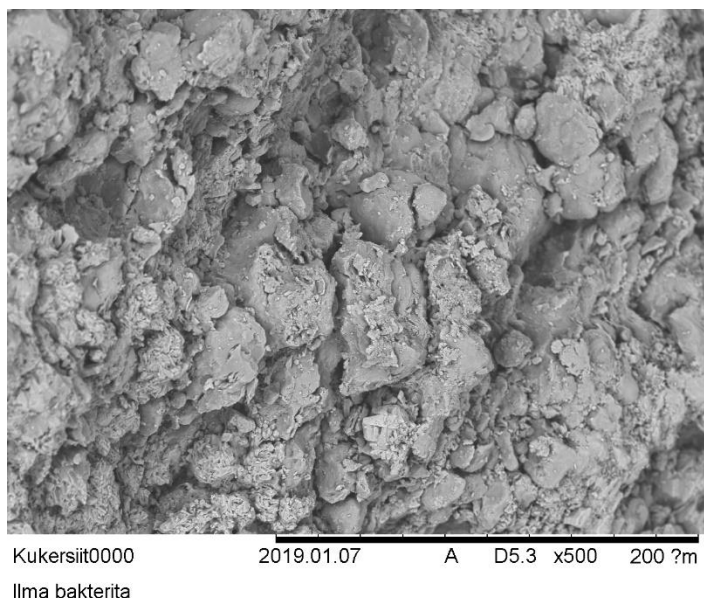
Gaasiproovidest määrati ka diveiniksulfiidi  $\text{H}_2\text{S}$  sisaldust, kuid selle sisaldust ei tuvastatud. (määramispiiriks oli 0,1%).



**Joonis 20.** Gaasifaasi koostis anaeroobsetes kultiveerimiskatsetes põlevkivi+ inokulum 5A

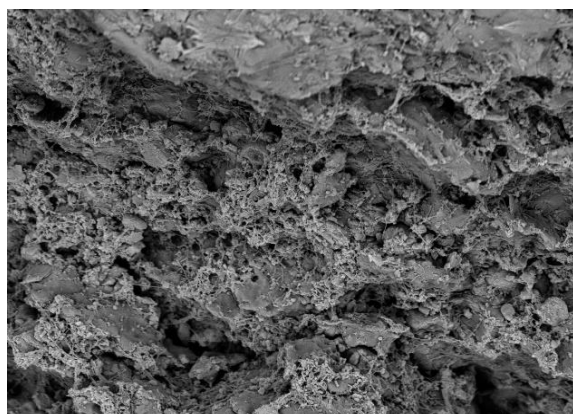
#### 4.2.3 Anaeroobse biofilmi iseloomustamine

Anaeroobsetest katsete mikrobioloogilise mõju hindamiseks Eesti põlevkivi pinnale tehti SEM fotosid. Joonisel 21 on näha mikrobioloogiliselt töötlemata põlevkivi pinda 500 kordset suurendusega. Põlevkivi pinda vaadates on selgelt näha, et pind on ebaühtlane ning teravate servadega, mis on soodne biofilmi kinnitumiseks.



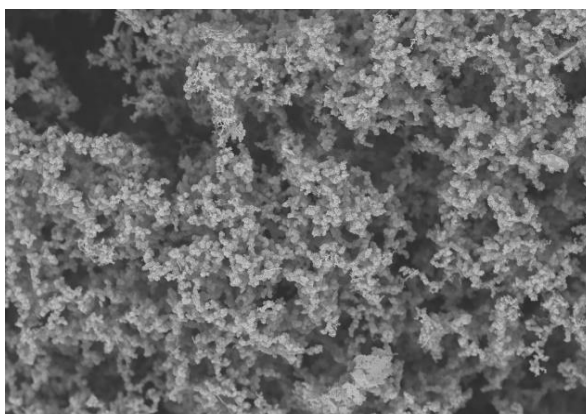
**Joonis 21.** Mikrobioloogiliselt töötlemata Eesti põlevkivi, 500x suurendus.

Joonisel 22 on näha põlevkivi biofilmi erinevusi loomuliku koosluse ja kooslusega 5A. Kooslusega 5A katses eraldus metaan ning erinevus biofilmis paistab välja ka SEM fotodel. Fotodel on näha koki-laadsete mikroorganismide klastereid. On teada, et niisuguseid klastereid võivad moodustada arhed perekonnast *Methanosarcina* [73]. Loomuliku kooslusega anaeroobselt töödeldud põlevkivi pinnal niisuguseid klastereid ei leidunud. Põlevkivi loomulik kooslus metaani ei eraldanud. Klastrite pinnasadestiste uurimiseks teostati EDX analüüs (joonis 23). Tulemused näitasid, et pinnal leidis süsinikku, kaltsiumit ja hapnikku ning suure tõenäosusega on tegu kaltsiumkarbonaadiga. Kaltsiumikarbonaadi sadenemine pärsib metanogeensete arhede elutegevust ning aeglustab biogaasi eraldumist [74]. Põlevkivi anaeroobsetes katsetes oli lag-faas 15 päeva ja biogaasi eraldumine kestis keskmiselt 45 päeva (joonis 19), mille põhjuseks võib olla inhibeerimine kaltsiumkarbonaadiga.



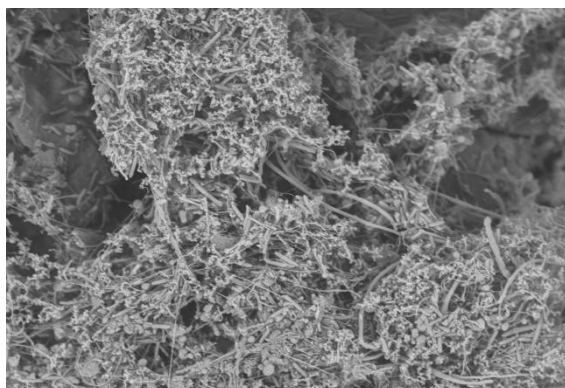
142 - Kuk.0012 2019.01.29 N D6.7 x1.0k 100 ?m  
tükk + lisaks puru (kylg)

Loomuliku kooslusega anaeroobselt töödeldud Eesti põlevkivi, suurendus 1000



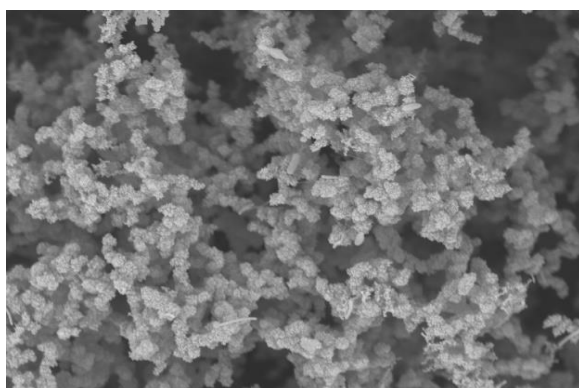
140\_kuker0037 2019.02.28 16:28 N D4.7 x1.0k 100 ?m

Kooslusega 5A anaeroobselt töödeldud Eesti põlevkivi, suurendus 1000



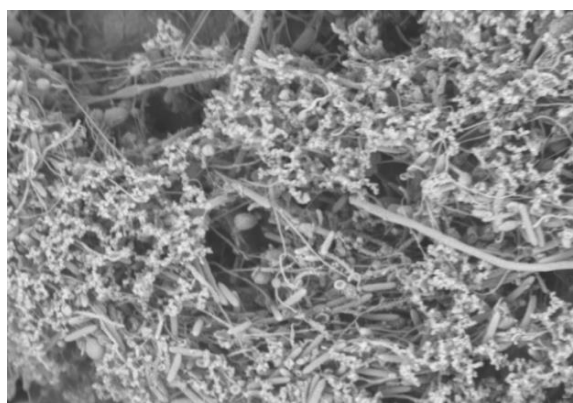
142\_kuker0026 2019.02.28 15:55 N D4.9 x2.5k 30 ?m

Loomuliku kooslusega anaeroobsel töödeldud Eesti põlevkivi, suurendus 2500



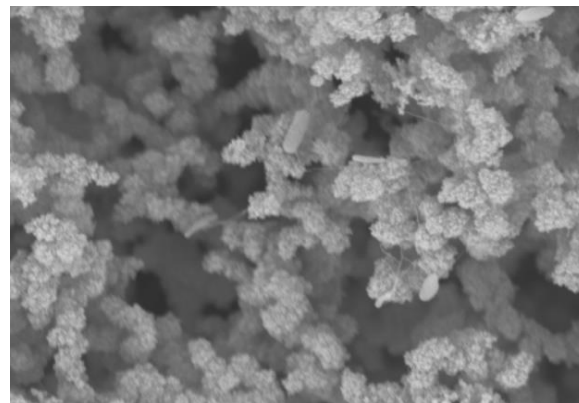
140\_kuker0038 2019.02.28 16:29 N D4.7 x2.5k 30 ?m

Kooslusega 5A anaeroobselt töödeldud Eesti põlevkivi, suurendus 2500



142\_kuker0021 2019.02.28 15:39 N D4.0 x5.0k 20 ?m

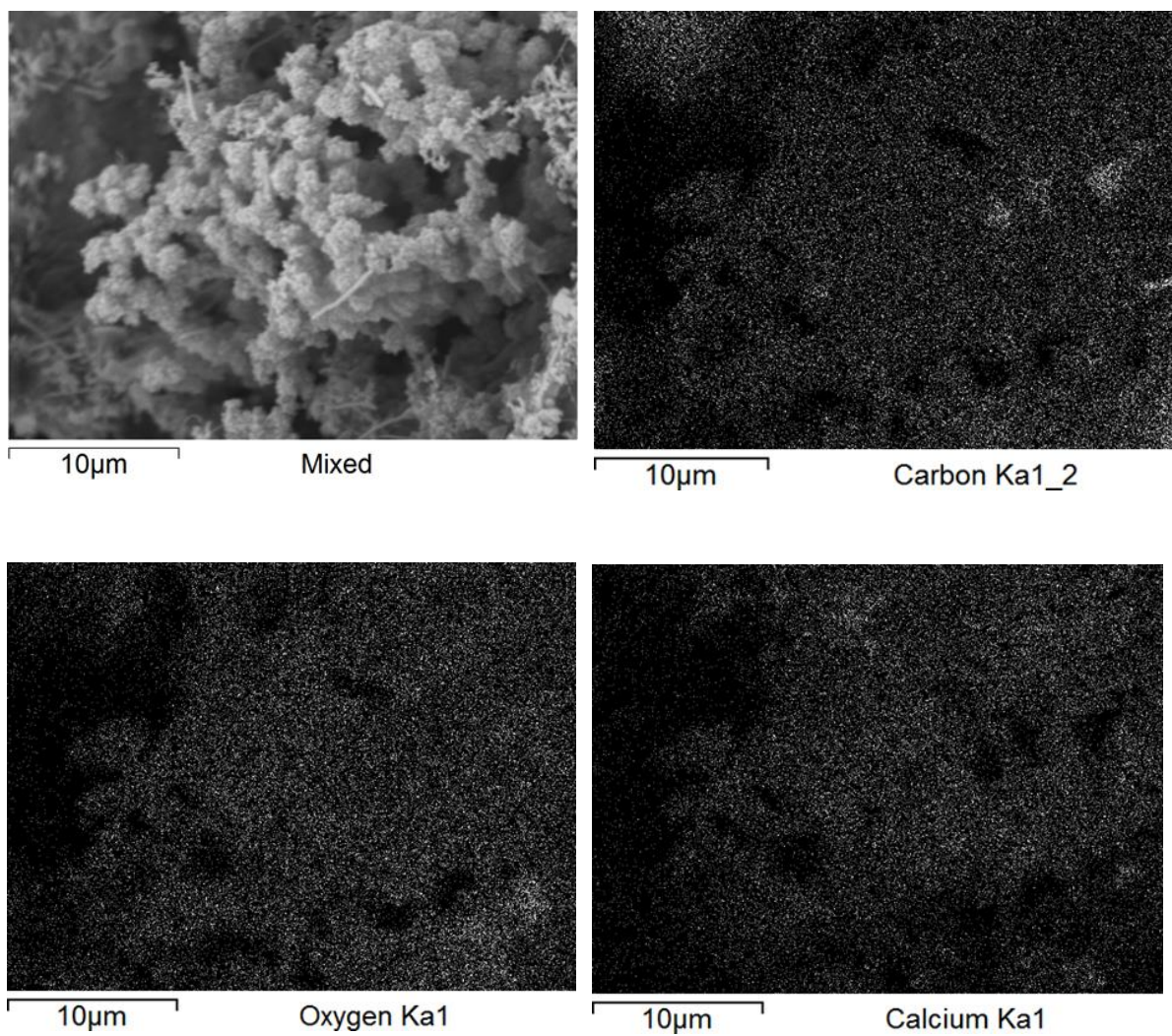
Loomuliku kooslusega anaeroobsel töödeldud Eesti põlevkivi, suurendus 5000



140\_kuker0039 2019.02.28 16:30 N D4.7 x5.0k 20 ?m

Kooslusega 5A anaeroobselt töödeldud Eesti põlevkivi, suurendus 5000

**Joonis 22.** Anaeroobse töötuse mõju põlevkivi pinnale.



**Joonis 23.** Kaltsiumiühendid biofilmil.

## 5. Arutelu

### 5.1 Mikroorganismide arvukus

Mikroorganismide arvukus kultiveerimiskatsetes on seotud orgaanilise aine kättesaadavusega. Põlevkiviga läbi viidud katsetest selgus, et põlevkivi kuumtöötlemine (3-kordne autoklaavimine (121°C) 24-tunniste vahedega) ei hävita põlevkivis olevate mikroorganismide endospore, vaid pigem lõhustab orgaanilist ainet. Orgaanilise aine lõhustamise tagajärjel muutub see mikroorganismidele kergemini kättesaadavaks [69] ning mikroorganismide arvukus proovides suureneb. Kuumtöötlemise tõttu saavutati söötmega R2A katsetes kõrged mikroorganismide arvukused ( $10^8$ ) ka neis katsetes, kuhu algselt inokulumi lisatud ei olnud. Sarnast tendentsi on märgatud ka varasemalt graptoliitargilliidiga läbiviidud katsete puhul [30,67]. Lisaks on ka varasemalt leitud, et üksnes söötmega on võimalik rikastada kooslus, mis on antud materjali lagundamiseks sobivaim [30].

### 5.2 Metallide lahustuse sõltuvus pHst

Aeroobsetes kultiveerimiskatsetes nii Eesti kui ka Jordaania põlevkiviga oli pH katse alguses neutraalne, kuid tõusis kiiresti aluseliseks (joonis 14 ja 15). pH andmeid on oluline vaadata metallide saagikuse andmetega paralleelselt, sest leostumine sõltub keskkonna redokspotentsiaalst ja pH-st, mida kirjeldavad Pourbaix diagrammid. [75] (lisad 6-11)

Vaadates Eesti põlevkivi ja Jordaania põlevkivi metallide saagiseid (joonised 16 ja 17) on näha, et Eesti põlevkivi puhul saavutati suurim saagis arseeni puhul (39%). See langeb kokku ka Lewis et al [76] metallisulfiidide lahustuvuse sõltuvusega pHst (lisa 11), mille graafikult on näha et arseen on lahuses just pH 7-14 juures. Vaadates Pourbaix graafikut (lisa 6) on näha, et pH 7-8,5 juures on oksüdeerivatel tingimustel (+0,2 kuni + 0,8 V) arseen lahustunud  $\text{HAsO}_4^-$  kujul. [75] Arseni sisaldus on kahjulik maakide töötlemiseks kasutatavatele seadmetele [26]. Põlevkivi katsete tulemusena väljakujunenud koosluse kõrge arseni eraldamisvõime tõttu võiks seda kooslust kasutada bioremediatsioonis ja põlevkivi töötlemiseks enne õli valmistamist.

Nikli madalat saagikust (Eesti põlevkiviga kuni 3% ja Jordaania põlevkivi 7%) võib seostada liiga aluselise pH-ga, sest nikkel on lahuses happelise pH (0-6) juures; pH 7-12 sadeneb nikkel välja (lisa 11) [76]. Ka Pourbaix graafikult (lisa 7) on näha, et pH 7-9 juures on nikkel väga vähe dissotseerunud kujul  $\text{Ni}^{2+}$ -na ning enamuse on tahke  $\text{Ni(OH)}_2$ . [75]

Vanaadiumi lahustus Eesti põlevkivist aeroobselt maksimaalselt kuni 1,5% ning Jordaania põlevkivist kuni 2%. Vanaadium lahustub väga laias Eh-pH piirkonnas (lisa 8). Tahkena on ainult veidi  $V_2O_4$  ja  $V_2O_3$ , millena vanaadium on just keskmistel pH ja oksüdatiivsetel tingimustel. pH 7,5-9 ning oksüdatiivsetel tingimustel on vanaadium tahke  $V_2O_3$  ning lahustuva  $H_2VO_4^-$  ning  $HVO_2^-$ . Vanaadium ei lähe sageli eraldi oksiidi vaid on seotud pigem teiste oktaeedriliste savimineraalidega. [75]

Strontsiumi madal saagikus (maksimaalselt 0,67% Eesti põlevkiviga ja 3% Jordaania põlevkiviga) on seotud strontsiumi pH 4,2-14 juures tahkes olekus olemisega (lisa 9). pH 4,2-7,8 on strontsium sulfaatne ( $SrSO_4$ ) ja pH 7,8-14 karbonaatne ( $SrCO_3$ ). [75]

Seleen on maakoos haruldane element, mida leostus Jordaania põlevkivist kuni 7%. Madalat leostumist võib seostada, sellega et oksüdatiivsetel tingimustel Eh +0,2- +0,8 V ning pH 7-9 juures on enamus seleeni tahkel Se kujul, vaid osa on lahustunud  $HSeO_3^-$ ,  $HSeO_4^{2-}$  ja  $SeO_4^{2-}$  (lisa 11). Looduslikult on seleen väävliga seotud. [75]

### 5.3 Elementanalüüs

Teostatud elementanalüüsiga saadi huvitavaid tulemusi, kus üldväävlis sisaldus tahkes jäägi vähenes kuni 32%, samas kui C, H ja N sisaldused suurenesid. Eesti põlevkivi proov elementanalüüsiks võeti suhteliselt katse alguses – 20. katsepäeval, kui kivimi mikrobioloogiline lagundamine oli alles alanud ja analüüsitav materjal võis sisaldada rohkesti lagundamise vaheprodukte (C-, H- ja N- sisaldavad metaboliidid). Ühtlasi võis analüüsitud tahke jääk sisaldada ka märkimisväärse osa bakterirakkude biomassi.

Põlevkivi vähenenud väävlisisalduse uurimiseks mõõdeti anaeroobsete katsete käigus gaasilise  $H_2S$  sisaldust gaasis, kuid seda ei tuvastatud (alla 0,1%). Seega ei ole tahkes jäägis vähenenud väävel divesiniksulfiidina lendunud. Väävlisisalduse vähenemise ja väävlivormide uurimiseks teostatakse täiendavaid katseid.

### 5.4 Metanogenees

Metaani tootlikkust Eesti põlevkivist saab võrrelda varasemalt patendis WO2017140324 ning Triin Korbi magistritöös avaldatud [30,67] graptoliitargilliidist saadud metaani kogusega. Sarnaselt Eesti põlevkiviga läbiviidud katsetele kasutati ka seal söödet R2A, metanogeneesi substraadina betaiini, anaeroobsus tagati  $Ar$  lisamisega ning temperatuur oli 37°C. Graptoliitargilliidist eraldus biogeenset gaasi kuni 7,73 mmol/g argiliidi kohta 41. katsepäevaks



(lisa 12) [65,66], samas kui Eesti põlevkivist eraldus 58. katsepäevaks 5,77 mmol/g põlevkivi kohta (lisa 5). Sealjuures on orgaanilise aine sisaldus argillidis 2-4 korda väiksem kui põlevkivis. Lisaks suuremale biogeense gaasi eraldumisele oli argiliidiga katsete lag-faas ja eksponentsiaalne faas lühemad võrreldes põlevkivi katsetega, vastavalt 7 ja 21 päeva ning 15 ja 45 päeva. Üheks põhjuseks võib olla rauamineraalide redutseerimine metanogeensete arhede poolt, millega kaasneb metaani tootmise inhibitsioon [77].

#### 5.4.1 Kaltsiumi mõju metanogeneesile

Anaeroobse granuleeritud muda kujunemises on kaltsiumil oluline roll. Piisava kaltsiumi kontsentratsiooni juures aitab see kaasa settimisele ja muda tekkele, kuid kui seda on liiga palju tekivad probleemid, nt metanogeense aktiivsuse langemine [78,79]. Kaltsiumkarbonaat sadeneb graanulite pinnale kõrgendatud pH juures, siis kui graanuli pinnal on sadenemist soosiv mikrokeskkond. Anaeroobse lagunemise käigus võib metanogenees viia pH tõusuni. Seega võib kaltsium sadet näha metanogeenidega kaetud pinnal. [80] Kõrge kaltsiumi sisaldusega reovee töötlemisel oli märgatav metanogeense aktiivsuses langus seotud kaltsiumkarbonaatse sademe moodustumisega [78,79]. Kaltsiumi mõju on uuritud ka tapamaja reovee anaeroobse käitlemisega seoses. Kui proovi lisati 0-3 g/l kaltsiumi siis oli biogaasi tootmise lag-faas 28-31 päeva ning kui kaltsiumi oli 5 g/l ja rohkem siis 43-52 päeva. 3 g/l kaltsiumi korral oli lag-faas lühem, kui kaltsiumit lisamata proovil. 3 g/l kaltsiumi sisalduse juures oli ka suurim biogaasi tootlikkus. Samas kui kaltsiumi oli 5 g/l või üle selle oli biogaasi tootmine inhibeeritud. [74]

Eesti põlevkivi mineraalne osa sisaldab CaO 34-60% [8,9], mistõttu on oluline arvestada selle võimalikku mõju metanogeneesile ja metallide leostumisele. Varasema teadustöö tulemusena [81] on avastatud, et metanogeenid sadestavad kaltsiumkarbonaati ning karbonaatse kihi kasvades väheneb metanogeenide kokkupuutepind. Kokkupuute vähenedes saab pärsitud metallide eraldamine ning karbonaatse kihi paksenedes häirib see ka metanogeenide aktiivsust. [81] Analooget nähtust kinnitas antud töö käigus leitud mõnesid mikroorganisme (oletatavasti metanogene) kattev kaltsiumkarbonaadi kiht (joonis 23). Karbonaatide kuhjumise tõttu jäävad mikroorganismid mineraalsesse kihti kinni ning nende elutegevuse aktiivsus väheneb drastiliselt. [81]

## 6. Kokkuvõte

Eesti põlevkivi ehk kukersiit on põhiline Eestis kasutatav energiaallikas, mida on kaevandatud juba üle 100 aasta. Lisaks põlevale osale ehk kerogeenile sisaldab põlevkivi ka metalle ning mikroorganisme. Ulatuslike katsete tulemusena on leitud, et nii aeroobsed kui ka anaeroobsed mikroorganismid on võimelised põlevkivi kerogeeni kasutama energiaallikana ning põlevkivis olevaid metalle bioleostama.

Antud töö eesmärgiks oli uurida põlevkivi mikrobioloogilise töötlemise võimalusi Eesti ja Jordaania põlevkivi näitel, rikastada vastavad mikroobikooslused ja töötada välja kohane analüüsimeetodika.

Mikrobioloogiliseks töötlemiseks kasutati nii põlevkivi enda mikroorganismide kultuuri kui ka lisatud kultuuri. Töö käigus uuriti mikroorganismide arvukust, metallide leostamist ning anaeroobsetes katsetes metaani ja süsihappegaasi tootmise võimekust.

Põlevkivi töötlemiseks kasutati eelnevalt graptoliitagrilliidiga adapeeritud kooslust inokulum 98. Inokulum adapeeriti Eesti põlevkiviga kaheksa edasikülviga 339 päeva jooksul ning välja kujunenud kooslust kasutati Jordaania põlevkivi aeroobseks mikrobioloogiliseks töötlemiseks. Eesti põlevkivi töödeldi ka anaeroobselt kooslusega 5A. 5A kooslus on graptoliitargilliidiga anaeroobsetes tingimustes adapeeritud kooslus, mis sisaldab metanogeenseid arhesid ning leostab metalle. Metanogeenide sisalduse tõttu on 5A sobilik kooslus metaani tootmise uurimiseks.

Aeroobsete katsete tulemusena saavutati nii Eesti kui ka Jordaania põlevkiviga kõrgeid mikroorganismide arvukusi (kuni  $10^8$ ) R2A söötmega. Tänu kõrgele mikroorganismide arvukusele sobib R2A sööde põlevkivi mikrobioloogiliseks töötlemiseks hästi. Eesti põlevkivi katsetest oli suurim arseeni saagis (39%) ja Jordaania põlevkivil seleeni (7,1%) ja nikli (7%) saagis.

Anaeroobsete katsete tulemusena eraldus tänu 5A koosluse lisamisele 59. katsepäevaks biogeenset gaasi 5,77 mmol/g. Intensiivne biogaasi eraldumine algas 15 katsepäeval. Sellele eelnes lag-faas, mille jooksul ei lagundanud metanogeensed arhed põlevkivi orgaanilist ainet intensiivselt. Lag faas võib olla seotud ka põlevkivis sisalduva kaltsiumiga. Kaltsiumi inhibeerivat toimet on oluline tulevaste katsete planeerimisel arvestada.



## 7. Järeldused

- Mikroorganismide loomuliku koosluse rikastamiseks Eesti põlevkivilt sobib sööde R2A paremini kui sööde M9.
- Argillilt eraldatud koosluse (kooslus 98) adapteerimise tulemusena sobib sama kooslus ka Jordaania põlevkivi mikrobioloogiliseks töötlemiseks, kuigi Jordaania põlevkivi loomuliku kooslusega saavutati mõnevõrra suurem mikroorganismide arvukus.
- Orgaanilise aine lõhustamise tagajärjel kuumtöötlemise tõttu muutub see mikroorganismidele kergemini kättesaadavaks, kusjuures saavutati kõrge mikroorganismide arvukus ka katsetes, kuhu algselt inokulumi lisatud ei olnud.
- Metallide leostamiseks on sööde M9 sobivam. Aeroobsetes kultiveerimiskatetes Eesti põlevkiviga leostus märkimisväärses koguses arseeni. Jordaania põlevkiviga katsetest leostusid enim Ni ja Se (sööde R2A).
- Üldväävli sisaldus põlevkivi kultiveerimiskatsete tahkes jäägis vähenes kuni kolmandiku võrra, samas kui C, H ja N sisaldused suurenesid, tingituna lagundamise vaheproduktide ja bakterirakkude biomassi sisaldusest.
- Eesti põlevkivi orgaanilisest osast on võimalik anaeroobsetes tingimustes argilliidilt eraldatud mikroorganismide kooslusega 5A edukalt metaani eraldada.
- Põlevkivis sisalduva kaltsiumkarbonaadi tõttu tõusis pH vaatamata söötmetes sisalduvatele puhverdavatele komponentidele (pH=8,5-9).
- Anaeroobsete katsete puhul võib põlevkivi kaltsiumkarbonaadi sisaldus metanogeneesisle pärssivalt mõjuda, mistõttu on oluline selle mõju tulevastes katsetes arvestada.

## 8. Summary

The continuous growth of human population and its energy consumption rises the need to find new energy sources. Along with energy the need for scarce metals grows as well. Estonia and whole of Europe highly depends on importing these metals. Oil shale in Estonia has been used for energetical purposes for over a century now. Mining and processing of oil shale guarantees Estonia its energetical independence for producing electricity and heat but comes with heavy impact on environment. Little studies have been made to evaluate the alternative ways of processing and mining of oil shale.

Alternative ways of mining could produce biogas while leaching metals from oil shale. The biomining technologies used on industrial scale so far depend on acidophilic pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) oxidizing microorganisms. Less studies have been made with aerobic heterotrophic bacteria consortia. Previous studies with Estonian graptolite argillite indicate that leaching of metals along with anaerobic digestion is possible.

The aim of this thesis is to study the effect of both aerobic and anaerobic microbiological processing to Estonian and Jordanian oil shale. The effect is studied via CFU/ml, pH, element analyses, metal leaching and anaerobic degradation of organic matter to methane and  $\text{CO}_2$ .

Aerobic degradation of Estonian oil shale organic matter were conducted in 339 days (8 passages). During this time initial inoculum from graptolite argillite (ARGCON 5) was successfully adapted to Estonian oil shale (upto  $10^8$  CFU/ml) and then used to inoculate Jordanian oil shale experiments. ARGCON 5 contains methanogenic and metals leaching microorganisms. The highest yield of metals is 39% of arsenic with Estonian oil shale and 7% of selenium with Jordanian oil shale was achieved. As the developed consortia leaches arsenic it can be used in bioremediation technologies.

pH in aerobic tests become from pH 7 to 8,5-9 very quickly. It may be due to  $\text{CaCO}_3$  contents of oil shale.

Microbiological processing was also studied in anaerobic conditions. After the lag-phase of 15 days the pressure within the anaerobic digester (Oxitop) started to rise and methane made upto 49% and  $\text{CO}_2$  upto 12% of gaseous phase.

The following conclusions were made

- R2A medium is better medium than M9 for enrichment of Estonian oil shale natural consortium
- As a result of adaption the same inoculum from Graptolite argillite (inoculum 98) is suitable for Jordanian oil shale microbiological processing, even though slightly bigger number of microorganisms was obtained with Jordanian oil shale natural consortium
- Thermal treatment of oil shale degrades its organic material making it easier for microorganisms to use. High number of microorganisms was obtain even in tests with initial inoculum.
- M9 medium is more suitable for leaching of metals. In aerobic tests with Estonian oil shale high yield of arsenic was obtained. Ni and Se leached the most from Jordanian oil shale aerobic tests (R2A medium).
- Total sulphur contents in solid residue of Estonian oil shale decreased upto one third, while C, H and N contents increaced. The increase of C, H and N was due to degradation intermediates and biomass of bacteria cells.
- Organic matter of Estonian oil shale can be successfully anaerobically degraded with inoculum of Graptolite argillite (inoculum 5A) to produce methane.
- Due to  $\text{CaCO}_3$  in oil shale pH was high (pH=8,5-9) even with buffering components of R2A and M9 medium.
- $\text{CaCO}_3$  can inhibit methanogenesis in anaerobic tests which is why it is important to take it into account in future tests.

## Tänuõnad

Sooviksin tänada

- oma juhendajaid Anne Menertit, Hans Priksi ja Triin Korbi igakülgse toe ning nõu eest;
- Päärn Paistet, Kaja Orupõldu ja Olga Pihli analüüside teostamise eest;
- „Põlevkivi ja poolkoksi mikrobioloogilise töötlemise rakendusüingu “ ning RITA1 projekti LLTOM17351 asutusi ning seotud osapooli;
- ettevõtet BiotaTec OÜ.

## Kasutatud kirjandus

- [1] Kattai V. 2000. Estonian Kukersite-oil shale resource./ Proceeding the articles of Tolerable extraction of oil shale.  
[http://www.ene.ttu.ee/maeinstituut/konver/ptk2000.html?fbclid=IwAR1pFwUZrhQk4H1dkovTudgxFujcRbAYNt17ZnVMMmjeCHWbiA26yOr\\_aXs](http://www.ene.ttu.ee/maeinstituut/konver/ptk2000.html?fbclid=IwAR1pFwUZrhQk4H1dkovTudgxFujcRbAYNt17ZnVMMmjeCHWbiA26yOr_aXs).
- [2] Häsänen E., Aunela-Tapola, L., Kinnunen V., Larjava K., Mehtonen A., Salmikangas T., Leskelä J., Loosaar J., 1997. Emission factors and annual emissions of bulk and trace elements from oil shale fueled power plants. *Science of The Total Environment*, 198, 1, 1-12. doi: 10.1016/S0048-9697(97)05432-6.
- [3] Aaloe A., Bauert H., Soesoo A., 2006. Kukersiit- Eesti põlevkivi.  
[http://www.gi.ee/geoturism/Polevkivi\\_CMYK\\_062011\\_100dpiS.pdf](http://www.gi.ee/geoturism/Polevkivi_CMYK_062011_100dpiS.pdf).
- [4] Fuel calorific values (<http://cngeurope.com/fuel-calorific-values/>) viimati külastatud 21.11.2018.
- [5] Calorific value of waste <http://www.igniss.com/calorific-value-waste> viimati külastatud 30.05.2019.
- [6] Kaasik A., Vohla C., Mötlep R., Mander Ü., Kirsimäe K., 2008. Hydrated calcareous oil-shale ash as potential filter media for phosphorus removal in constructed wetlands. *Water research*, 42, 4-5, 1315-1323. doi: 10.1016/J.WATRES.2007.10.002.
- [7] Tammeoja T., Loko M., Valgma I., Karu V., Tohver T., 2007. Oil shale reserves in Estonia. Doctoral school of energy- and geo-technology. URL: <https://www.researchgate.net/publication/220009303>.
- [8] Mittal S., Garg M., Sande P.C., 2016. Characterisation and Comparison of Oil Shale and Crude Oil. *Confernece paper of 6th World Petro Coal Congress*.
- [9] Koel, M. 1999. Estonian oil shale.
- [10] Al-Makhadmeh L., Maier J., Al-Harashneh M., Sscheffnecht G., 2015, Oxyfuel technology: Oil shale desulfurisation during unstage combustion. *Fuel*, 158, 460-470. doi: 10.1016/j.fuel.2015.05.059.
- [11] Põlevkivitööstusest tulevate veekeskkonnale ohtlike ainete mõju uuring  
[https://www.envir.ee/sites/default/files/polevkivitoostusest\\_tulevate\\_veekeskkonnale\\_ohtlike\\_ainete\\_moju\\_uuring.pdf](https://www.envir.ee/sites/default/files/polevkivitoostusest_tulevate_veekeskkonnale_ohtlike_ainete_moju_uuring.pdf) 21.11.2018

- [12] Mis on põlevkivi? ([https://www.ttu.ee/public/p/polevkivi-kompetentsikeskus/Mis\\_on\\_polevkivi.pdf](https://www.ttu.ee/public/p/polevkivi-kompetentsikeskus/Mis_on_polevkivi.pdf) ) viimati külastatud 21.11.2018.
- [13] Gavrilova O., Vilu R., 2010, A life cycle environmental impact assessment of oil shale produced and consumed in Estonia *Resources, Conservation and Recycling*, 55, 232-245. doi: 10.1016/j.resconrec.2010.09.013.
- [14] Põlevkivi kasutamise riiklik arengukava 2016-2030  
[https://www.riigiteataja.ee/aktiis/3180/3201/6002/RKo\\_16032016\\_Lisa.pdf](https://www.riigiteataja.ee/aktiis/3180/3201/6002/RKo_16032016_Lisa.pdf)
- [15] Kaevandamine Eesti Energia  
<https://www.energia.ee/tehnoloogia/kaevandamine>
- [16] Laherrere J., 2005, Review of oil shale data.  
<http://www.hubbertpeak.com/laherrere/OilShaleReview200509.pdf>
- [17] Harzia H. 2007, Põlevkivi poolkoksi leostuskäitumise uurimine: väävliühendite leostumine. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- [18] Eesti Statistikaamet. Energia bilanss aastal 2002.
- [19] Euroopa Liidu direktiiv 2001/81/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2001 on national emission ceilings for certain atmospheric pollutants. Official J 2001;L309:0022–30
- [20] Prikk A. Põlevkivituhk-teke, mõju keskkonnale ja kasutamine. Aruanne, Tallinna Tehnika Ülikool, Tallinn, 2004.
- [21] Ots A., Oil shale combustion technology, *Oil Shale*, 2004, 21, 2, 149-160. TTÜ.
- [22] Soone, J., Doilov S., 2003. Sustainable utilization of oil shale resources and comparison of contemporary technologies used for oil shale processing. *Oil Shale*, 20, 3, 311 – 323.
- [23] Erg K., 2005, Groundwater sulfate content changes in Estonian underground oil shale mines. PhD Thesis on power engineering and geotechnology AAED02  
<https://digi.lib.ttu.ee/i/?12>
- [24] Eesti Energia aastaaruanne 2008/09. Eesti Energia. <http://www.energia.ee>

- [25]Kupits T., Metsur M., Salu M., Kais P., 2004. Ohtlike jääkreostuskollete kontroll ja uuringud. AS Maves, Tallinn: Aruanne;  
[http://www.maves.ee/Projektid/2004/OJRK\\_aruanne\\_nr\\_3116.pdf](http://www.maves.ee/Projektid/2004/OJRK_aruanne_nr_3116.pdf) viimati külastatud 26.02.2019
- [26]Rawling D. E., Johnson D. B., 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153, 2, 315-324. doi: 10.1099/mic.0.2006/001206-0
- [27]Watling, H.R. (2015) Review of biohydrometallurgical metals extraction from polymetallic Mineral Resources. *Minerals*, 5, 1-60. doi: 10.3390/min5010001
- [28]Mishra, D.; Rhee, Y-H. (2010) Current research trend of microbiological leaching for metal recovery from industrial wastes. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology; p. 1289-1296.
- [29]Uhrynowski W., Debiec K., Sklodowska A., Drewniak L., 2017. The role of dissimilatory arsenate reducing bacteria in the biogeochemical cycle of arsenic based on the physiological and functional of *Aeromonas* sp O23A. *Science of Total Environment*, 598, 680-689. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2017.04.137.
- [30]Patent WO2017140324 Method for decomposition of the metallorganic matter of Graptolite-argillite by microbial consortium.
- [31]Watling H., 2016. Microbiological Advantages of Biohydrometallurgy. *Minerals*, 6, 2, 49. doi: 10.3390/min6020049.
- [32]Heinaru, Naanuri, 2011. „Praktilisi töid mikrobioloogias“ praktikumi juhend. Tartu Ülikool.
- [33]Shiers D. W., Collinson D. M., Watling H. R. 2016. Life in heaps: a review of microbial responses to variable acidity in sulfide mineral bioleaching heaps for metal extraction. *Research in Microbiology*, 167, 7, 576-586. doi: 10.1016/J.RESMIC.2016.05.007.
- [34]Nanchaiah V. Y., Mohan V. S., Lens P. N. L., 2016. Biological and Bioelectrochemical Recovery of Critical and Scarce Metals. *Trends in Biotechnology*, 34, 2, 134-155. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2015.11.003.

- [35]Matlakowska R., Sklodowska A., 2009. The culturable bacteria isolated from organic-rich black shale potentially useful in biometallurgical procedures. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 3, 858-866. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04261.x.
- [36]Kutschke S., Guezennec A. G., Hedrich S., Schippers A., Borg G., 2015. Bioleaching of Kupferschiefer blackshale: A reviews including perspectives of the Ecometals project. *Minerals Engineering*, 75, 116-125. doi: 10.1016/j.mineng.2014.09.015.
- [37]Drahota P., Filipi M., 2009. Secondary arsenic minerals in the environment: A review. *Environment International*, 35, 8, 1234-1255. doi: 10.1016/J.ENVINT.2009.07.004
- [38]Pradhan N., Nathsarma K.C.,Srinivasa Rao K., Sukla L.B., Mishra B.K, 2008. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering*, 21, 5, 355-365. doi: 10.1016/J.MINENG.2007.10.018.
- [39]Poulin, R. and R.W. Lawrence (1996) Economic and environmental niches of biohydrometallurgy, *Miner Eng*, 9, 799-810.
- [40]Brierley C. L., Brierley J.A, 2013. Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes of the mineral industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 17, 7543-7552. doi: 10.1007/s00253-013-5095-3.
- [41]Chen Y., Cheng J.J., Creamer K. S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99, 10, 4044-4064. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2007.01.057.
- [42]Conrad R., 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 3, 193-202. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00575.x.
- [43]Naik, S.N., Goud V. V., Rout Prasant K., Dalai A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 2, 578-597. doi: 10.1016/J.RSER.2009.10.003.
- [44]Mesle M, Periot C, Gilles Dromart G., Oger P., 2015. Methanogenic microbial community of the Eastern Paris Basin: Potential for energy production from organic-rich shales. *International Journal of Coal Geology*, 149, 67-76. doi: 10.1016/j.coal.2015.07.002.



- [45]Conrad R., 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 5, 285-292. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x.
- [46] Karakashev D., Batstone D. J., Angelidaki I. 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1, 331–338. doi: 10.1128/AEM.71.1.331-338.2005.
- [47]Angelidaki I., Karakashev D., Batstone D. J., Plugge C. M., Stams A. J. M., 2011. „Biomethanation and Its Potential“ *Methods in Enzymology*, 494. doi: 10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0.
- [48]Arbon I. M., 2002. Worldwide use of biomass in power generation and combined heat and power schemes. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*,. 216, no. 1, pp. 41–58, 2002.
- [49]Widdel F., Rabus R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 3, 259-276. doi: 10.1016/S0958-1669(00)00209-3.
- [50]Insam H., Franke- Whittle I., Goberna M., 2010. Microbes in Aerobic and Anaerobic Waste Treatment. *Microbes at Work*, 1-34. doi: 10.1007/978-3-642-04043-6\_1.
- [51]Colosimo F., Thomas R., Lloyd J.R., Taylor K. G., Boothman C., Smith A. D., Lord R., Kalin R. M., 2016. Biogenic methane in shale gas and coal bed methane: A review of current knowledge and gaps. *International Journal of Coal Geology*, 165, 106-120. doi: 10.1016/J.COAL.2016.08.011.
- [52]de Bok, F. A. M., Harmsen H. J. M., Plugge C. M., de Vries M. C., Akkermans A. D. L., de Vos W. M., Stams A.J. M., 2005. The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 4, 1697-1703. doi: 10.1099/ij.s.0.02880-0.
- [53]Syntrophy  
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(Boundless\)/16%3A\\_Microbial\\_Ecology/16.4%3A\\_Nutrient\\_Cycles/16.4C%3A\\_Syntrophy\\_and\\_Methanogenesis](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/16%3A_Microbial_Ecology/16.4%3A_Nutrient_Cycles/16.4C%3A_Syntrophy_and_Methanogenesis) viimati külastatud 02.06.2019.

- [54]Wutcher C., Banning E., Mincer T.J, Drenzek N.J., Coolen M.J.L., 2013. Microbial diversity and methanogenic activity of Antrim Shale formation waters from recently fractured wells. *Frontiers in Microbiology*, 4, 367, doi: 10.3389/fmicb.2013.00367.
- [55]Watkins A. J., Roussel E. G., Parkes R. J., Sass H., 2014. Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococcoides* spp). *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1, 289-293. doi: 10.1128/AEM.03076-13.
- [56]Ticak T., Hariraju D., Bayron Arcelay M., Arivett B.A, Fiester S.E., Ferguson Jr D. J., 2015. Isolation and characterization of tetramethylammonium degrading *Methanococcoides* strain and the novel glycine betaine utilizing *Methanlobus* strain. *Archives of Microbiology*, 197, 2, 197-209. doi: 10.1007/s00203-014-1043-6.
- [57]Orem, W.H., Voytek, M.A., Jones, E.J.P., Lerch, H.E., Bates, A.L., Corum, M.D., Warwick, P.D., Clark, A.C., 2010. Organic intermediates in the anaerobic biodegradation of coal to methane under laboratory conditions. *Organic Geochemistry*, 41, 997–1000. doi: org/10.1016/j.orggeochem.2010.03.005.
- [58]Summers Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., Lovley, D. R. 2010. Direct Exchange of Electrons Within Aggregates of an Evolved Syntrophic Coculture of Anaerobic Bacteria, *Science*, 330, 6009, 1413-1415. doi: 10.1126/science.1196526.
- [59]Thauer R. K., Kaster A-K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R., 2008. c. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 8, 579-591. doi: 10.1038/nrmicro1931.
- [60]Thauer R. K., 2011. Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO<sub>2</sub>. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 3, 292-299. doi: 10.1016/J.MIB.2011.03.003.
- [61]Knittel K., Boetius A., 2009. Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology*, 63, 311-334. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093130.
- [62]M9 mineral medium Sigma-Aldrich  
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6030?lang=en&region=EE&gclid=Cj0KCQjw\\_r3nBRDxARIsAJIjleFfiLrfVPtWWRvCJ--TtAPODhCStYf6ws3qojAfLB4aa1xn8R2rzLYaAq9jEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6030?lang=en&region=EE&gclid=Cj0KCQjw_r3nBRDxARIsAJIjleFfiLrfVPtWWRvCJ--TtAPODhCStYf6ws3qojAfLB4aa1xn8R2rzLYaAq9jEALw_wcB)

- [63]R2A medium LABM <http://www.labm.com/products/r2a-broth.asp>.
- [64]Menert, T., 2015, Usage options of common reed (*Phragmites australis*) as raw material for biogasgeneration. Master's thesis,Tallinn University of Technology, 74pp.
- [65]Menert A., Heinaru A., Korb T., Orupõld K., Teemusk A., Sepp H., Menert T., Ilmjärv T., Paiste P., Kirsimäe K., Mander Ü., Sipp Kulli S., Kivisaar M., Anaerobic microbial decomposition of recalcitrant organic matter with leaching of metals. Unpublished data, 2018.
- [66]Menert A., Kivisaar M.,2018 „RITA1/01-01-02 Bioleostumise kasutusvõimalused metallideeraldamiseks Eesti graptoliitargilliidist“ Vahearuanne II kvartal 2018.
- [67]Korb T, 2016. Biodegradatiivse potentsiaaliga mikroobikooslused Eesti graptoliitargilliidist. Tartu Ülikool, magistritöö.
- [68]Scanning electron microscope  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_electron\\_microscope](https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope).
- [69]Włodarczyk, A.; Szymańska, A.; Bąkowska, A.; Skłodowska, A.; Matlakowska, R. 2016. Extracellular membrane structures – a component of the epilithic biofilm on the Kupferschiefer black shale. *Geomicrobiology Journal*, 34, 2, 166-175. doi: 10.1080/01490451.2016.1163625.
- [70]Kim J., Park C., Kim T.-H., Lee M., Kim S., Kim S.-W., Lee J. 2003. Effects of various pre-treatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 95(3), 271- 275. doi: org/10.1263/jbb.95.271.
- [71]Tenno T, Rikmann E, Zekker I, Tenno T, Daija L, Mashirin A., 2016. Modelling equilibrium distribution of carbonaceous ions and molecules in a heterogeneous system of CaCO<sub>3</sub>–water–gas. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 65(1): 68–771.07. doi: 10.3176/proc.2016.1.07.
- [72]Urov K., Sumberg A., 1992. Harakteristika garjutsih slantsev. Tallinn, Kirjastus Valgus
- [73]Conklin A., David Stensel H., Ferguson J., 2006. Growth Kinetics and Competition Between Methanosarcina and Methanosaeta in Mesophilic Anaerobic Digestion. *Water Environment Research*, 78, 5, 486-496.
- [74]Ahn J. H., Do T. H., Kim S. D., Hwang S. 2006. The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 30, 1, 33-38. doi: 10.1016/J.BEJ.2006.01.014.

- [75]Brooking G. B., 1987. Eh-pH Diagrams for Geochemistry.
- [76]Lewis A., 2010. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*, 104, 2, 222-234.
- [77]Yang, Shucheng He, Yanling Liu, Yonghong Chou, Charles Zhang, Pengxiang Wang, Dongqi, 2010. Effect of wastewater composition on the calcium carbonate precipitation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 4, 2, 142-149. doi: 10.1007/s11783-010-0026-3.
- [78]van Langerak, E.P.A. Gonzalez-Gil, G. van Aelst, A. van Lier, J.B. Hamelers, H.V.M. Lettinga, G, 1998. Effects of high calcium concentrations on the development of methanogenic sludge in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactors. *Water Research*, 32, 4, 1255-1263. doi: 10.1016/S0043-1354(97)00335-7.
- [79]El-Mamouni, R. Guiot, S. R. Mercier, P. Safi, B. Samson, R. 1995. Liming impact on granules activity of the multiplate anaerobic reactor (MPAR) treating whey permeate. *Bioprocess Engineering*, 12, 1. doi : 10.1007/s004490050083.
- [80]Fang, Herbert H.P. Chui, Ho-Kwong Li, Yu-You, 1995. Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Water Science and Technology*, 32, 8, 165-172. doi: 10.1016/0273-1223(96)00021-2.
- [81]Kip N., Jansen S., Leite M. F. A., de Hollander M., Afanasyev M., Kuramae E. E., Veen J., Van A., 2017. Methanogens predominate in natural corrosion protective layers on metal sheet piles. *Scientific Reports*, 7, 1. doi: 10.1038/s41598-017-11244-7.
- [82]Puura E. 1999. Technogenic minerals in the waste rock heaps of Estonian oil shale mines and their use to predict the environmental impact of the waste. *Oil Shale*, 16(2), 99–107.
- [83] Eesti põlevkivi energeetilise kasutamise parima võimaliku tehnika uuring. Tallinn 2016 Keskkonnauuringute Keskus  
[https://www.envir.ee/sites/default/files/pvt\\_lopparuanne\\_02.01.2017.pdf](https://www.envir.ee/sites/default/files/pvt_lopparuanne_02.01.2017.pdf).

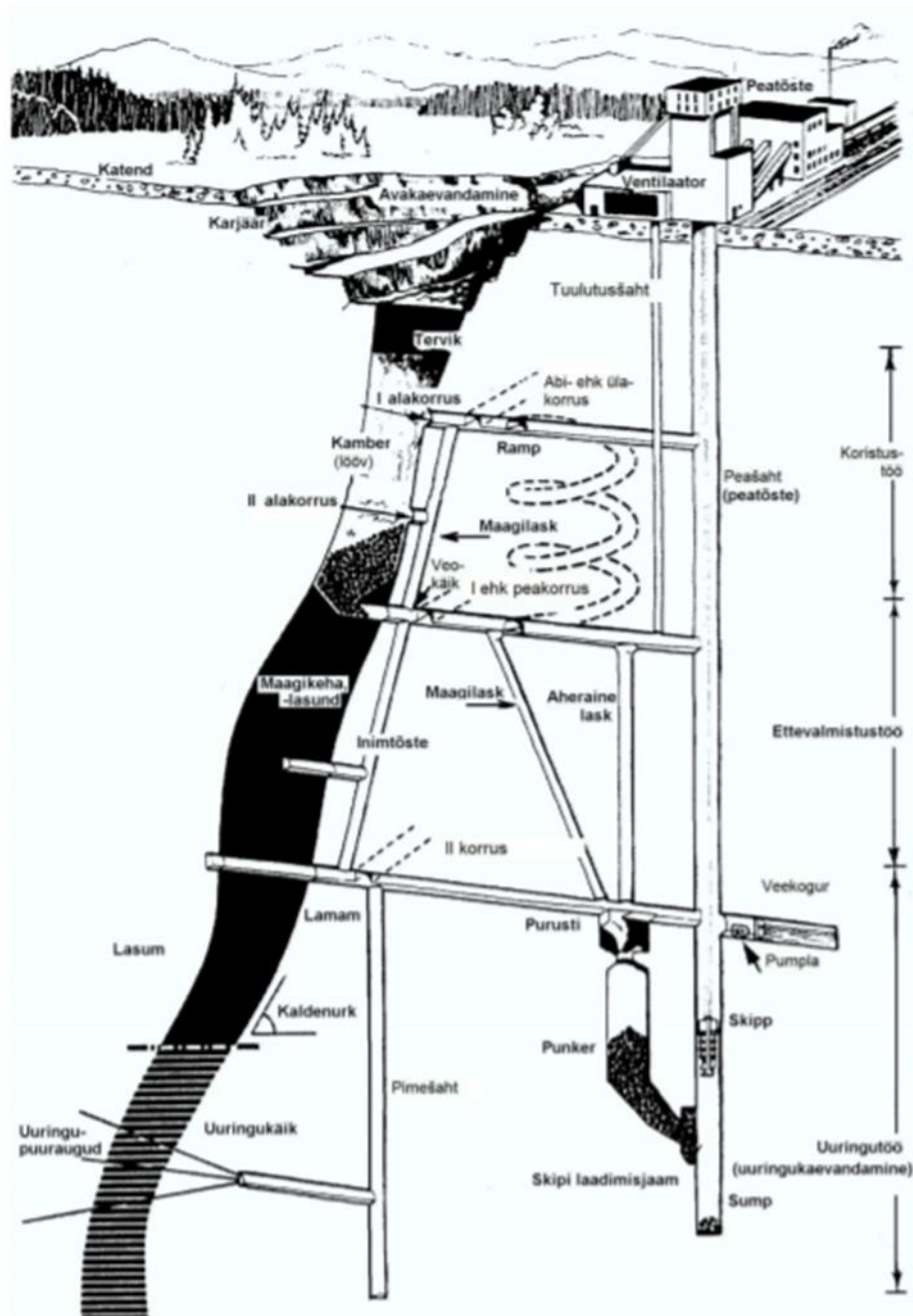
[84] Boone D.R., Chynoweth D. P., Mah, R. A., Smith P. H., Wilkie A. C. 1993. Ecology and microbiology of biogasification. *Biomass and Bioenergy*, 5, 3, 191-202. doi: 10.1016/0961-9534(93)90070-K.

[85] Ziemiński K., Frąc M., 2012. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 11, 18, 4127–4139. doi: 10.5897/AJBX11.054.

[86] Reinsalu, 2011. Põlevkivi varu hindamiskriteeriumite aruanne.

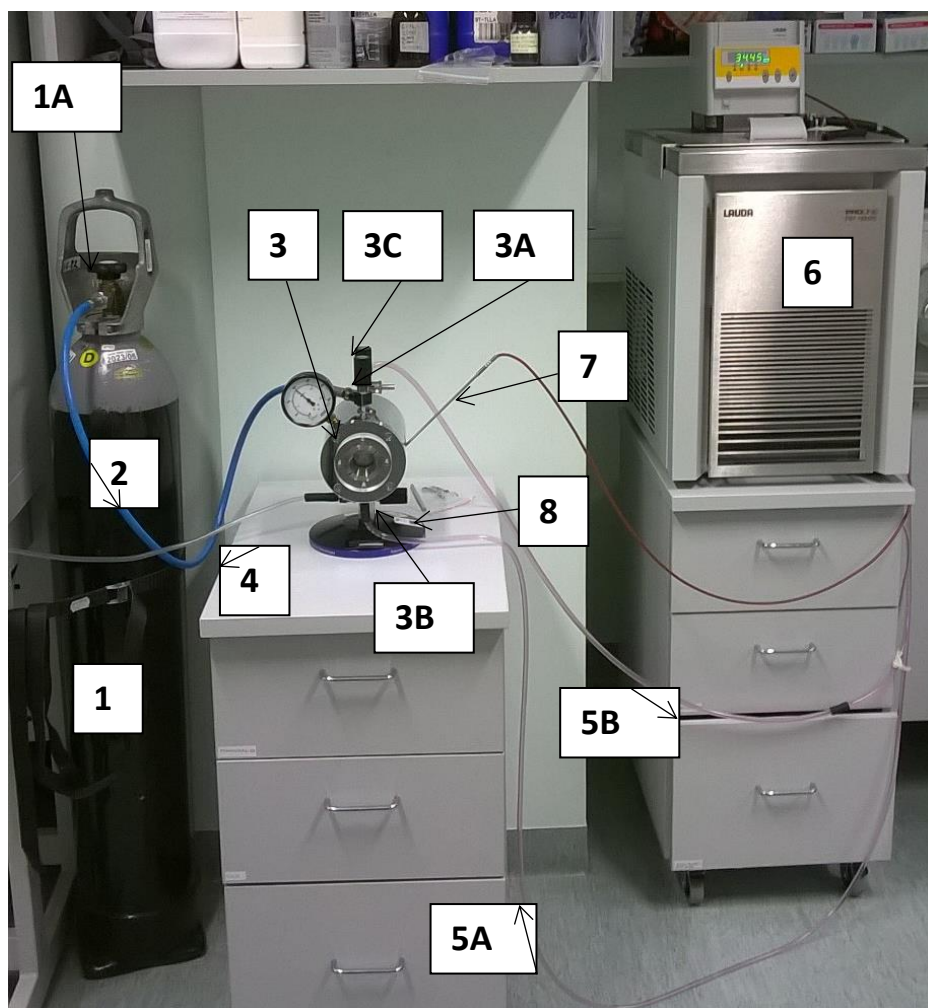
## Lisad

**Lisa 1.** Põlevkivi peal- ja allmaakaevandamine



Põlevkivi peal- ja allmaakaevandamine (Reinsalu, 2011)

## Lisa 2 Ülekriitilise kuivatamise juhend



Joonis 1. Ülekriitilise kuivatamise süsteem.

Ülekriitilise kuivatamise süsteemi osad (Joonis 1):

- Sifooniga CO<sub>2</sub> balloon - **1**  
ballooni kraan - **1A**
- Voolik CO<sub>2</sub> balloonist kõrgrõhureaktorini - **2**
- Manomeetriga kõrgrõhureaktor (Agar Scientific, B7010) - **3**
  - CO<sub>2</sub> sisselaskekraan - **3A**
  - CO<sub>2</sub> väljaskekraan - **3B**
  - Ventileerimiskraan - **3C**
- Väljaslaskevoolik, nool näitab voolu suunda - **4**
- Jahutussärgi sisselaskevoolik, nool näitab voolu suunda - **5A**
- Jahutussärgi väljaslaskevoolik, nool näitab voolu suunda - **5B**
- Termostaat Lauda Proline RP 1845 - **6**
- Temperatuuri mõõtmise sond - **7**

### ENNE ALUSTAMIST KONTROLLI,

- 1) et kõik voolikud oleks töökorras ja õigesti ning kindlalt ühendatud;
- 2) et termostaadiga **6** ühendatud tempeartuuri mõõtmise sond **7** oleks paigaldatud reaktori vastavasse avasse;
- 3) et väljaslaskevoolik **4** oleks suunatud tõmbekapi sobivasse solventi;
- 4) et reaktori kraanid **3A**, **3B** ja **3C** oleks suletud.

**Reaktori jalal on kirjas rõhu väärtus, mille korral puruneb ohutusklapp (127 bar/ 1850 psi). Seda rõhku EI TOHI reaktoris lasta tekkida!**






## KUIVATAMISE KÄIK

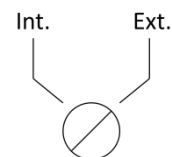
### Alustamine

Seadista termostaat 6 vastavalt seadme manuaalile:

- välisele tsirkulatsioonile (Joonis 2);
- reguleerima temperatuuri sondi järgi (*ConCP*) (Joonis 3):

Termostaadi seadistamine reguleerima välistemperatuuri

- 1) Vajuta nuppu  1 kord kirja *SET* kuvamiseni
- 2) Vajuta nuppu  2 korda kirja *Con I* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord
- 3) Vajuta nuppu  1 kord kirja *ConEP* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord




Joonis 2. Kruvi asend välise tsirkulatsiooni korral.



Joonis 3. Välise (st. reaktori) temperatuuri kontrollimise indikaator.






- kuvama sondi mõõdetud temperatuuri (indikaator **EXT**):

Termostaadi seadistamine kuvama sondi mõõdetud temperatuuri

- 1) Vajuta nuppu  indikaatorkirja **EXT** süttimiseni






- pumpama võimsusastmega 2 (*Pu 2*):

Termostaadi pumba seadistamine võimsusastmele 2

- 1) Vajuta nuppu  1 kord kirja *SET* kuvamiseni
- 2) Vajuta nuppu  1 kord kirja *Pu 0* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord
- 3) Vajuta nuppu  2 korda kirja *Pu 2* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord

1) Seadista reaktor temperatuurile 15 °C ja lase temperatuuril ühtlustuda:

Termostaadi temperatuuri seadistamine

- 1) Vajuta nuppu  1 kord kirja *SET* kuvamiseni ning vajuta uuesti nuppu  1 kord
- 2) Vajuta nuppu  või  vastavalt soovitud temperatuurini jõudmiseks ja vajuta nuppu  1 kord

2) Võta jahtunud reaktorist proovihoidik, täida hoidik sobiva CO<sub>2</sub>-ga seguneva solvendiga nii, et kuivatatavad objektid jäävad hoidikusse pannes vedelikuga kaetuks.



- 3) Tõsta objektidega hoidik tagasi reaktorisse ja sulge reaktor hoolikalt. **Kui reaktori keermestatud luuk on õiges asendis, peab see lõpuni sulguma väga kergelt ja käsitsi. Spetsiaalset reaktori võtit 8 kasutada vaid vajadusel luugi viimaseks pingutuseks.**
- 4) Ava kraanid **1A** ja **3A** ning täida reaktor kiiresti CO<sub>2</sub>-ga (15 °C juures täitub reaktor rõhuni ~58 bar). Jälgi reaktori täitmisel vaateaknast kolmanda faasi ilmumist reaktori põhja. See on solvent, millega oli täidetud proovihoidik. Faasi märkamisel avada koheselt ka kraan **3B**, et see reaktorist enne CO<sub>2</sub>-ga segunemist välja juhtida. Faasi kadumisel sulgeda kraan **3B** ning taas faasi ilmumisel kraan **3B** avada. Aktiivselt tuleb vaateakna kaudu solvendifaasi tekkimist jälgida umbes esimesed 15 minutit.

### CO<sub>2</sub>-ga läbiuhtumine (voolutamine)

- 5) Vooluta 5 minutit üsna intensiivselt reaktorist läbi vedelat CO<sub>2</sub>. Selleks on 5 minuti jooksul avatud kraanid **1A**, **3A** ja **3B**. Jälgida, et rõhk reaktoris voolutamise käigus ei langeks ehk CO<sub>2</sub> väljavool ei oleks suurem kui pealevool.
- 6) Siis sulge kraan **3B** ja seejärel kraan **3A** staatiliseks ekstraktsiooniks (solvendi difundeerumine vedelasse CO<sub>2</sub>-te. Staatiline ekstraktsioon kestab 30 minutit.
- 7) Korda tegevusi 5)-6) seni, kuni väljalaskevoolikusse **4** enam vedelikku ei voola ning reaktorist on väljumas näha tahkeid CO<sub>2</sub> lume tükke.
- 8) Vii läbi etapid 5)-6) veel 2 korda. **Pane tähele, et väga intensiivse väljavoolu korral võib CO<sub>2</sub> lumi väljalaskekraani 3B või vooliku 4 reaktori lähedalt ummistada ning rõhu all väljuv CO<sub>2</sub> võib voolikute halva ühenduse korral ühenduskohas välja paiskuda.** Et ummistusi etapis 8 ei tekiks, reguleerida CO<sub>2</sub> väljalaskekraani **3B** väiksemale väljavoolule.

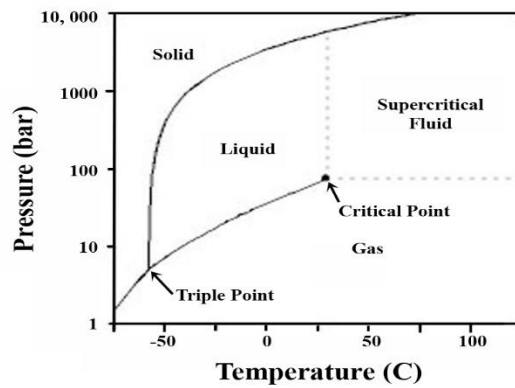
### Üle ülekriitilise oleku kuivatamine

- 9) Kontrolli, et kraanid **3A** ja **3B** on suletud. Sulge ka kraan **1A**. Reguleeri termostaat temperatuurile 35 °C jättes muud parameetrid samaks. Temperatuuri tõusmise ajal **EI TOHI REAKTORIT JÄTTA JÄRELVALVETA, sest temperatuuri tõustes gaas paisub ja suletud kraanide korral tõuseb rõhk reaktoris üle ohtliku piiri.** Jälgida temperatuuri tõstmise ajal tähelepanelikult reaktori manomeetrit. Lubada rõhul tõusta kuni 100 bar-ni ning seejärel avada väljalaskekraan **3B** nii, et rõhk püsiks kuni 35 °C saabumiseni 100 bar-i juures.

### Rõhu langetamine reaktoris

- 10) Kui reaktori temperatuur on jõudnud 35 °C juurde, jääb väljalaskekraan **3B** avatuks (samasse asendisse kui oli eelmise etapi lõpus) ning lastakse rõhul langeda atmosfäärirõhule.

**NB! Liiga kiire rõhu langetamine toob kaasa temperatuuri languse reaktoris ja põhjustab ülekriitilises olekus CO<sub>2</sub> kondenseerumise, mis rikub kogu kuivatamise tulemuse. CO<sub>2</sub> faasidiagrammilt (Joonis 4) nähtub, et rõhku võib kiirelt ja kondenseerumisohuta langetada ~60 bar-ist alates.**








Joonis 4. CO<sub>2</sub> faasidiagramm (<http://www.usask.ca/biology/scopes/CDP-%20CO2%20phase%20diagram.jpg> (19.12.2014)).

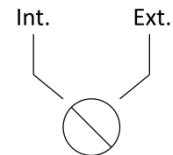
## Kuivatamise lõpetamine

11) Lülitada välja termostaat 6 ja seadistada see algolekusse:

- seesmisele tsirkulatsioonile (Joonis 5);
- reguleerima sisetemperatuuri (*Con I*) (Joonis 6):

Termostaadi seadistamine reguleerima sisetemperatuuri

- 1) Vajuta nuppu  1 kord kirja *SET* kuvamiseni
- 2) Vajuta nuppu  2 korda kirja *ConEP* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord
- 3) Vajuta nuppu  1 kord kirja *Con I* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord




Joonis 5. Kruvi asend seesmise tsirkulatsiooni korral.



Joonis 6. Välise (st. reaktori) temperatuuri kontrollimise indikaator välja lülitatud.






- kuvama sondi mõõdetud temperatuuri (indikaator **EXT** kustunud):

Termostaadi seadistamine kuvama sondi mõõdetud temperatuuri

- 1) Vajuta nuppu  indikaatorkirja **EXT** kustumiseni

- pumpama võimsusastmega 2 (*Pu 0*):

Termostaadi pumba seadistamine võimsusastmele 0

- 1) Vajuta nuppu  1 kord kirja *SET* kuvamiseni
- 2) Vajuta nuppu  1 kord kirja *Pu 2* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord
- 3) Vajuta nuppu  2 korda kirja *Pu 0* kuvamiseni ja vajuta nuppu  1 kord

12) Kui reaktoris on rõhk langenud atmosfäärirõhule, võib avada reaktori ja võtta välja hoidiku.

**Mõnikord näitab manomeeter atmosfäärirõhku, kuigi reaktor on veel teatud väikse rõhu all.**

Selleks tuleb enne reaktori avamist avada täielikult CO<sub>2</sub> väljalaskekraan 3B ning alles seejärel asuda avama reaktori luuki.

### Puhastamine

- 13) Peale reaktori kasutamise lõppu puhastada atsetooniga loputades objektihoidik ja puhastada atsetooniga niisutatud paberiga reaktori sisemus. Asetada hoidik tagasi reaktorisse ja sulgeda kambri luuk (käsitsi), et vältida tolmu sattumist reaktorisse.
- 14) Sulge kraan **3B** ja kontrolli, et suletud oleksid ka kraanid **1A**, **3A** ja **3C**.
- 15) Ühenda ettevaatlikult termostaadi küljest lahti reaktori särgi voolikud ning ühenda spetsiaalse lühikese voolikuga termostaadi välisotsikule mõeldud välja- ja sissevooluava.



Joonis 7. Termostaadi 6 välisotsikule mõeldud välja- ja sissevooluava ühendatuna spetsiaalse lühikese voolikuga.

Eestikeelne ülekriitilise kuivatamise juhend tugineb Agar Scientific B7010A ülekriitilise kuivatamise reaktori ja Termostaat Lauda Proline RP 1845 kasutusjuhendile, kuid sisaldab praktilisi kommentaare.

Koostas:

Dr. Anna-Liisa Peikolainen  
materjalitehnoloogia teadur  
Arukate materjalide ja süsteemide labor  
Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut

22.12.2014

**Lisa 3.** Generatsiooniajad Eesti põlevkivi aeroobsetele katsetele PK1A ja PK2A

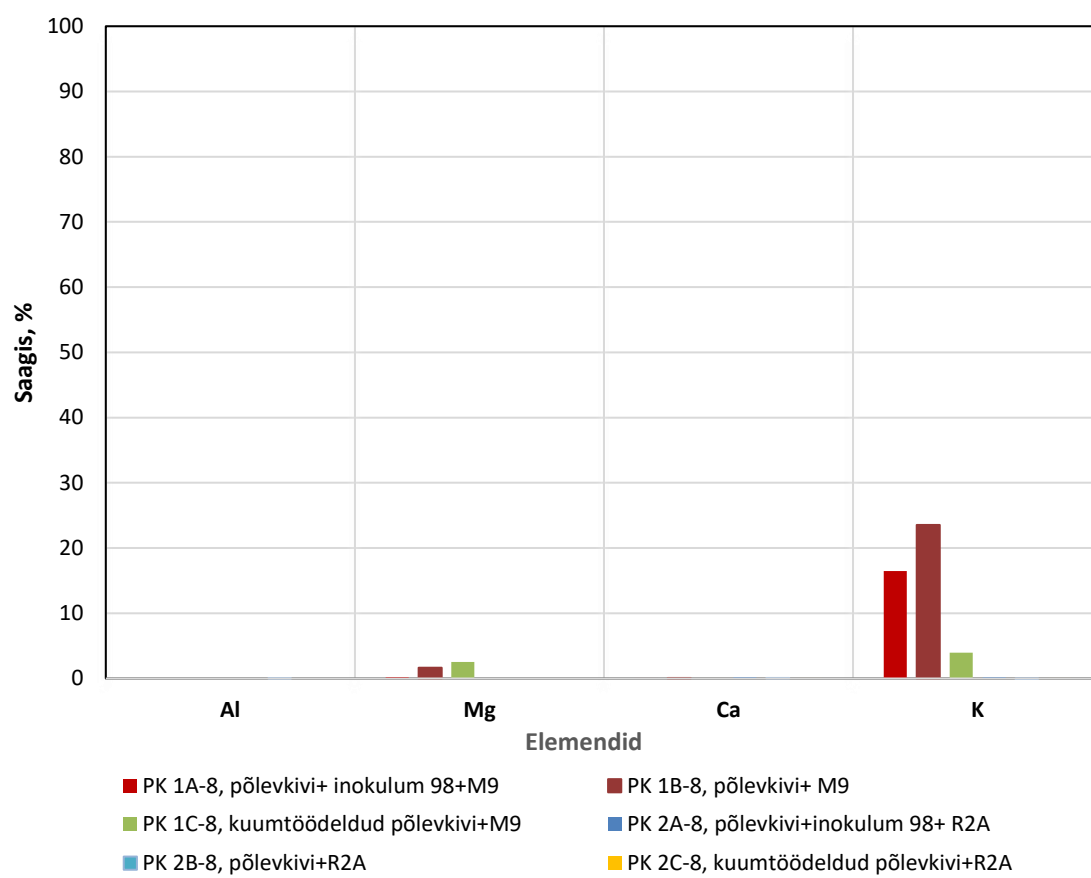
Generatsiooniaeg PK 1A (põlevkivi+ inokulum 98+ M9)

Edasikülvi arv	Katseliin PK-1A			
	Katse nr	Gener.-de arv	Eksp. faasi kestvus, päeva	Generatsiooni aeg, päeva
1	Katse PK1 A	4,37		
2	Katse PK1 A-1	12,71	7	0,55
3	Katse PK1 A-2	3,22	7	2,17
4	Katse PK1 A-3	8,55	5	0,58
5	Katse PK1 A-4	21,87	10	0,46
6	Katse PK1 A-5	5,45	14	2,57
7	Katse PK1 A-6	14,54	11	0,76
8	Katse PK1 A-7	1,66	15	9,02
9	Katse PK 1A-8	13,14	12	0,91
	<b>Kokku</b>	<b>35,96</b>	<b>60</b>	<b>1,67</b>

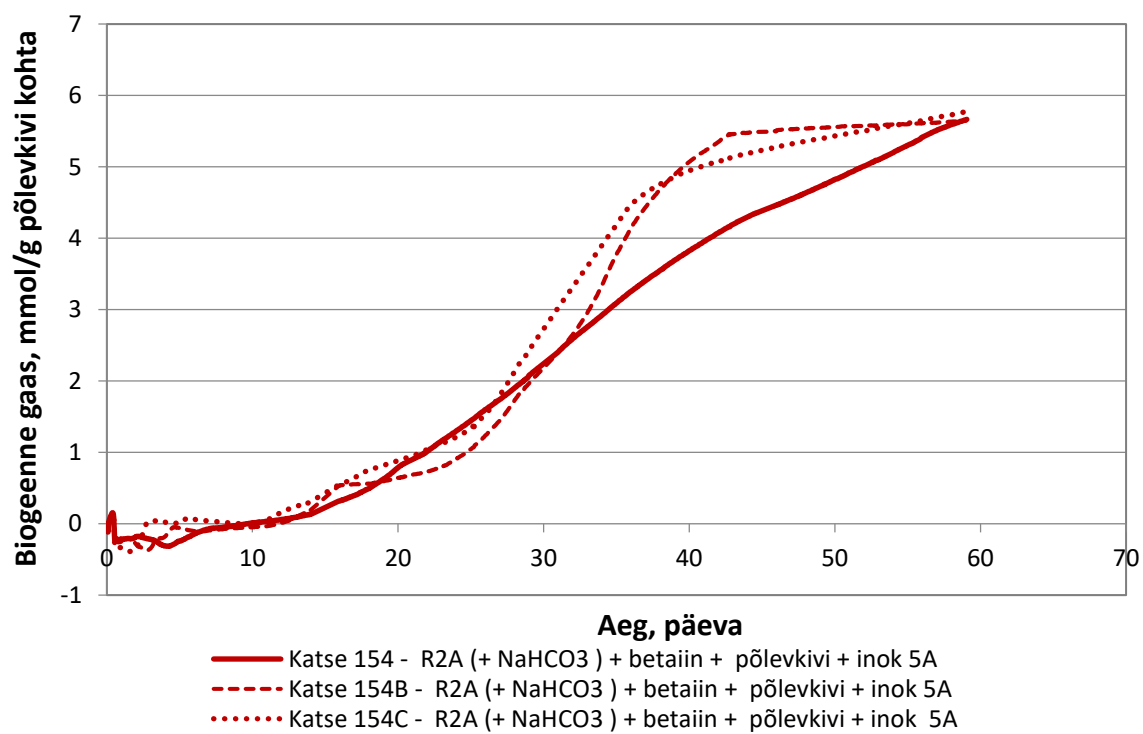
Generatsiooniaeg PK 2A (põlevkivi+ inokulum 98+ R2A)

Edasikülvi arv	Katseliin PK-2A			
	Katse nr	Gener.-de arv	Eksp. faasi kestvus, päeva	Generatsiooni aeg, päeva
1	Katse PK2 A	5,36		
2	Katse PK2 A-1	0,66	7	10,57
3	Katse PK2 A-2	6,04	7	1,16
4	Katse PK2 A-3	3,50	5	1,43
5	Katse PK2 A-4	2,87	10	3,48
6	Katse PK2 A-5	0,98	14	14,27
7	Katse PK2 A-6	23,98	11	0,46
8	Katse PK2 A-7	4,01	15	3,74
9	Katse PK2 A-8	6,14	12	1,95
	<b>Kokku</b>	<b>29,57</b>	<b>70</b>	<b>2,37</b>

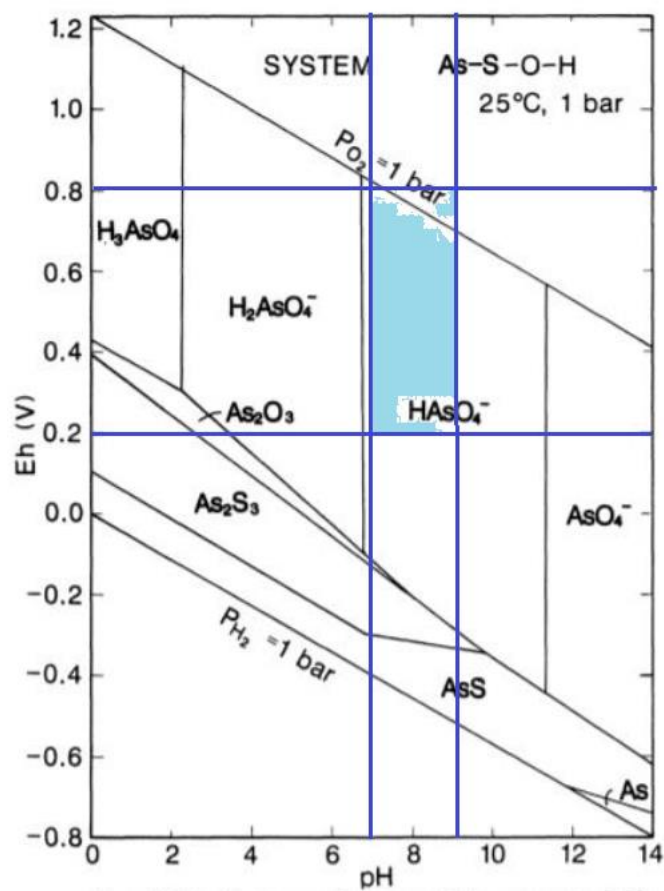
**Lisa 4.** Makroelementide leostumine Eesti põlevkivi katsetest



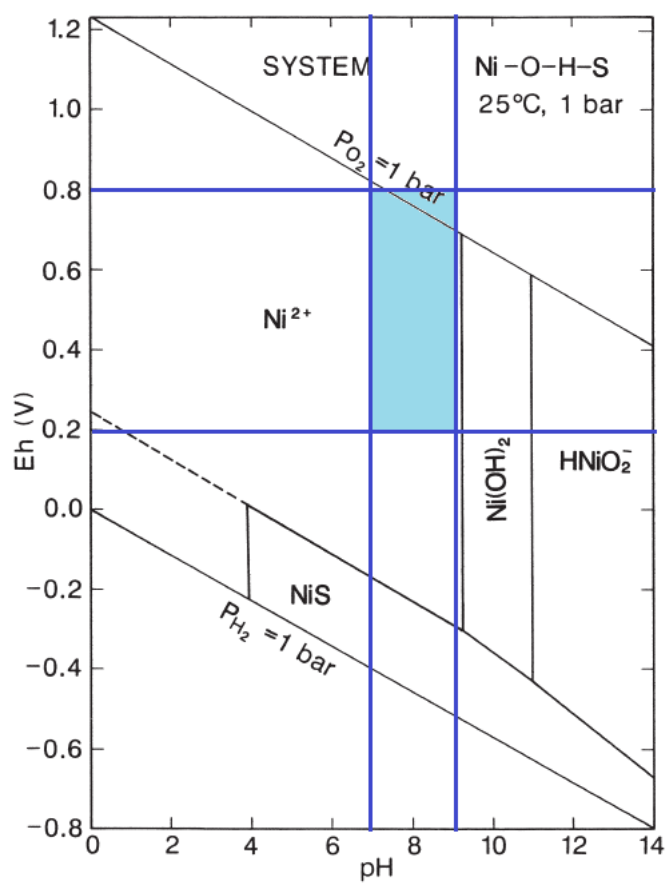
**Lisa 5.** Biogeense gaasi eraldumine Eesti põlevkiviga anaeroobsetest katsetest



Lisa 6. Arseeni lahustustuvuse sõltuvus Eh-pHst [76]

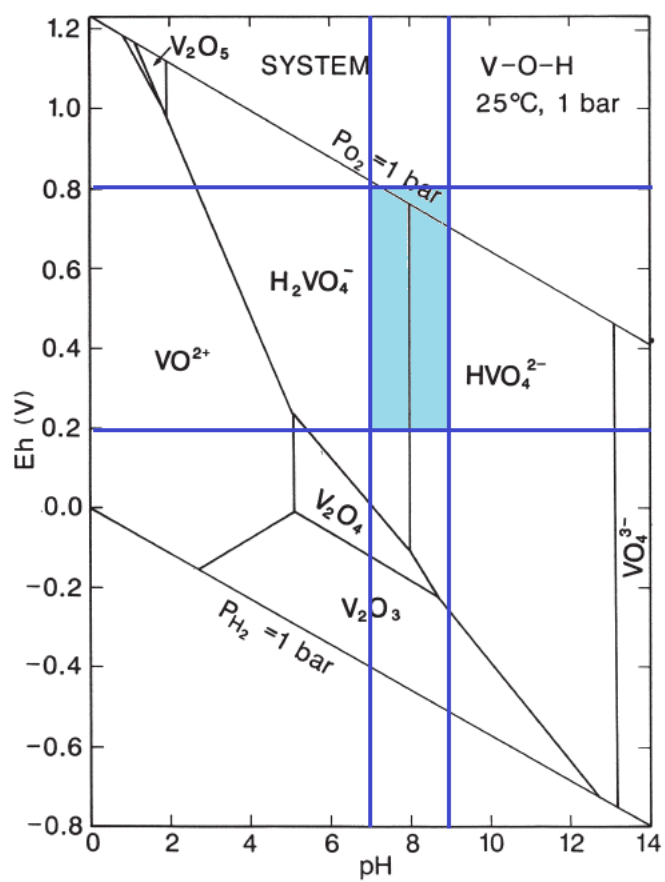


**Lisa 7.** Nikli lahustustuvuse sõltuvus Eh-pHst [76]

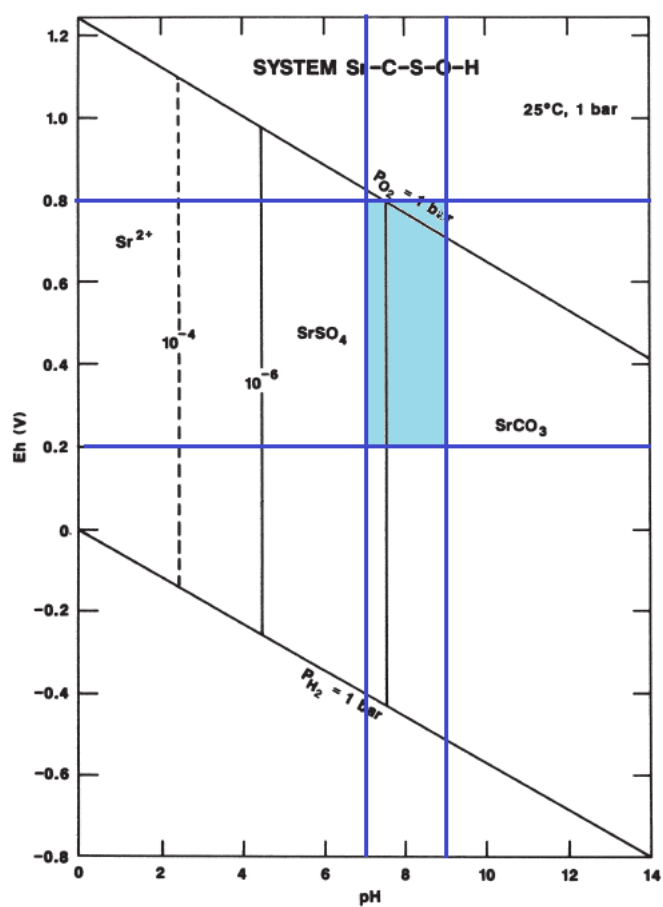




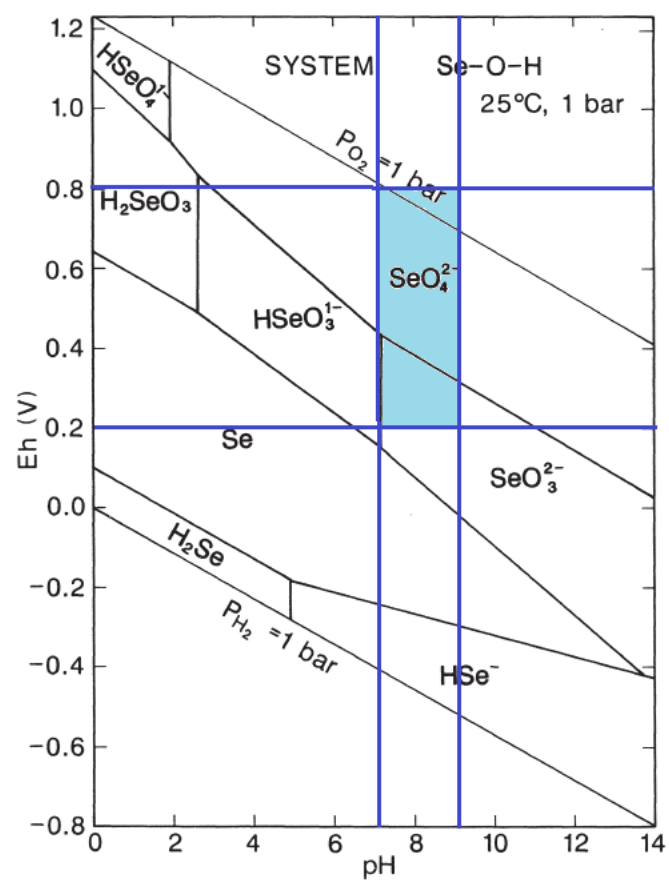
**Lisa 8.** Vanaadiumi lahustuvuse sõltuvus Eh-pHst [76]



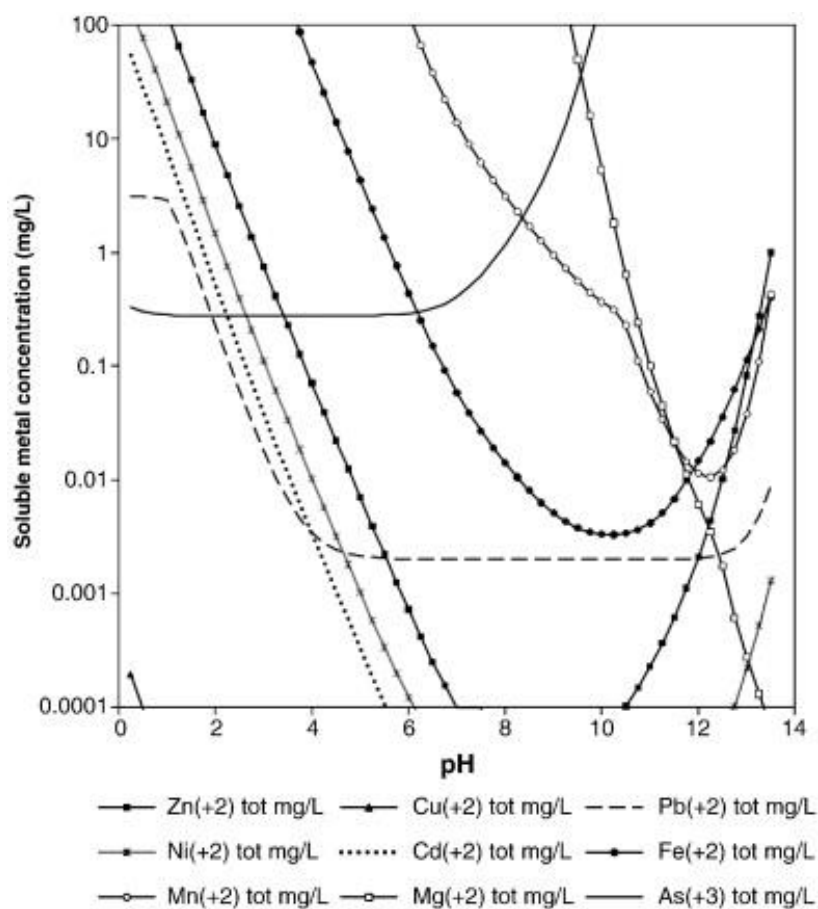
**Lisa 9.** Strontsiumi lahustustuvuse sõltuvus Eh-pHst [76]



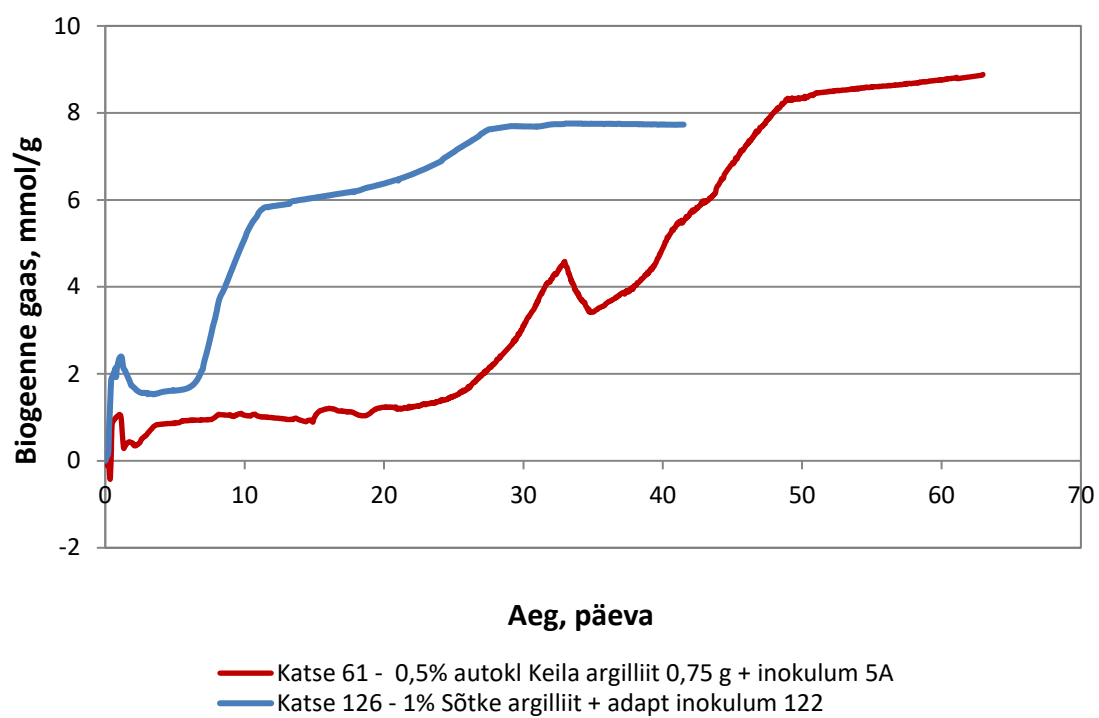
**Lisa 10.** Seeleni lahustustuvuse sõltuvus Eh-pHst [76]



**Lisa 11.** Metallisulfiidide lahustuvus sõltuvalt pH-st [76]



Lisa 12 Biogeense gaasi teke argilliidiproovide mikrokosmides inokulumiga 5A



# Lihtlitsents

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liselle Luks,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Põlevkivi mikrobioloogiline töötlemine“, mille juhendajad on Anne Menert, Hans Priks ja Triin Korb reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Liselle Luks

03.06.2019